

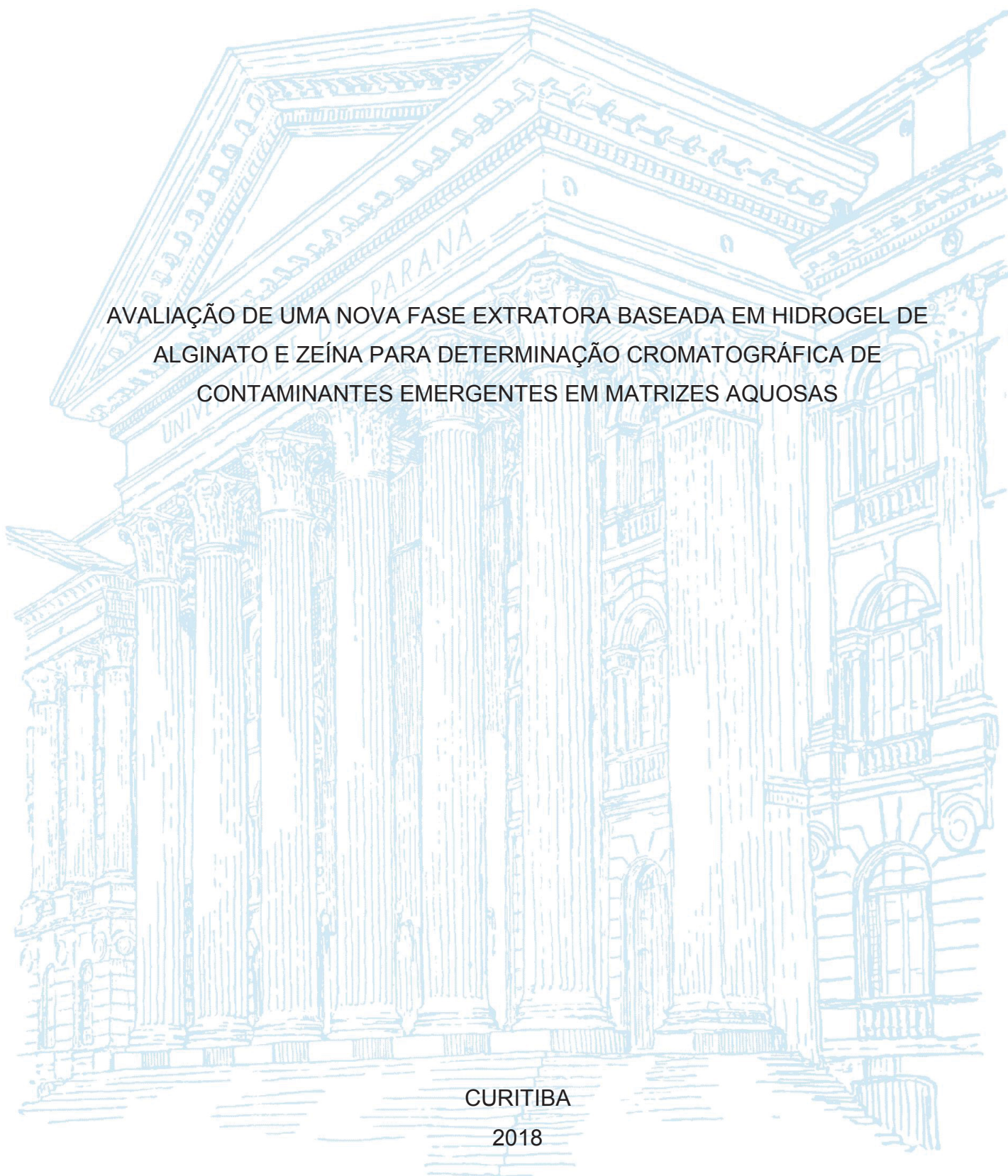
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATARA DUANE BORGES DE CASTILHOS

AVALIAÇÃO DE UMA NOVA FASE EXTRATORA BASEADA EM HIDROGEL DE
ALGINATO E ZEÍNA PARA DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE
CONTAMINANTES EMERGENTES EM MATRIZES AQUOSAS

CURITIBA

2018



NATARA DUANE BORGES DE CASTILHOS

AVALIAÇÃO DE UMA NOVA FASE EXTRATORA BASEADA EM HIDROGEL DE
ALGINATO E ZEÍNA PARA DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE
CONTAMINANTES EMERGENTES EM MATRIZES AQUOSAS

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Química, no
Curso de Pós-Graduação em Química, do
Setor de Ciências Exatas, da Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da
Silva.

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE
BIBLIOTECAS/UFPR BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

543

Castilhos, Natara Duane Borges de

Avaliação de uma nova fase extratora baseada em hidrogel de alginato e zeína para determinação cromatográfica de contaminantes emergentes em matrizes aquosas / Natara Duane Borges de Castilhos. – Curitiba, 2018.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva.

1. SPME. 2. GC-MS/MS. 3. Hormônios. 4. Cafeína. 5. Micropoluentes orgânicos.
I. Universidade Federal do Paraná. II. Silva, Bruno José Gonçalves da. III. Título.

CDD: 543

Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214


TERMO DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DE UMA NOVA FASE EXTRATORA BASEADA EM
HIDROGEL DE ALGINATO E ZEÍNA PARA DETERMINAÇÃO
CROMATOGRÁFICA DE CONTAMINANTES EMERGENTES EM
MATRIZES AQUOSAS**

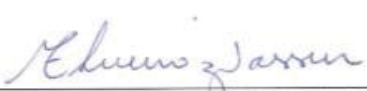
por

NATARA DUANE BORGES DE CASTILHOS

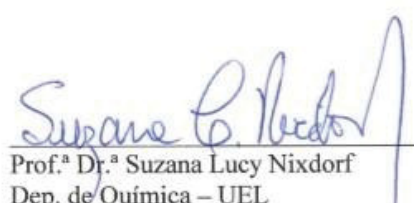
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:




Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva
Orientador
Dep. de Química – UFPR




Prof.ª Dr.ª Maria Eugênia Queiroz Nassur
Dep. de Química – FFCLRP/USP



Prof.ª Dr.ª Suzana Lucy Nixdorf
Dep. de Química – UEL



Prof.ª Dr.ª Andrea Pinto de Oliveira
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta-Zamora
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 28 de maio de 2018.

Aos futuros leitores dessa tese.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva agradeço a oportunidade de aprendizagem, agradeço por ser um orientador ativo e um grande incentivador pela busca do conhecimento. Sua contribuição foi de extrema importância para o meu amadurecimento acadêmico e profissional.

À CAPES pelo incentivo a pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, por ter unido meios para que meu sonho de estudar na Federal do Paraná fosse realizado.

À banca por estar presente e contribuir para o encerramento desse projeto.

À Prof.^a Dr.^a Izabel Cristina Riegel-Vidotti agradeço pela parceria formada e pelas grandes contribuições científicas fornecidas para este trabalho.

Aos amigos de laboratório pelas sugestões, críticas e apoio durante o desenvolvimento do trabalho. Aos amigos da vida pelos momentos compartilhados, vocês foram a minha família nesse período de estudos. À Paola por ser uma irmã mais velha e me aconselhar sempre, além de me estender a mão inúmeras vezes.

À minha mãe, Lorete, por acreditar em meu potencial e sempre que possível me lembrar do orgulho que sente pela pessoa que me tornei. Ao meu vovô, João (*in memoriam*), por ter respondido todas as perguntas que uma neta curiosa pode fazer e, especialmente, por ter me contado como conheceu a vovó e explicado quão feliz é a vida com amor.

Ao meu namorado, Vitor, por ter paciência com as minhas diversas fases e estar presente sempre que possível.

*“Everything should be made as simple
as possible, but not simpler”.*

(ALBERT EINSTEIN)

RESUMO

Na busca por métodos cromatográficos mais seletivos e sensíveis para análises ambientais, o desenvolvimento de novas técnicas de preparo de amostras, uma das etapas mais morosas e complexas dos procedimentos analíticos, tem sido amplamente avaliado. A microextração em fase sólida (SPME) tem ganhado destaque frente aos métodos convencionais, pois minimiza o volume da amostra e o consumo de solventes orgânicos, permite a reutilização das fases extratoras, a pré-concentração dos analitos, além de ser rápida e passível de automação. Apesar de algumas fases extratoras estarem disponíveis comercialmente para as análises por SPME/GC-MS/MS, o desenvolvimento de novas fases extratoras mais seletivas, estáveis e de baixo custo tem sido necessário para o avanço científico e maior abrangência da técnica. Dentre os diversos possíveis novos materiais, aqueles baseados em hidrogéis se mostram promissores para esta aplicação, pois o grande número de grupos funcionais os credenciam para extração tanto de compostos polares quanto menos polares. O objetivo deste estudo foi sintetizar e avaliar um novo dispositivo SPME, à base de hidrogel de alginato, para a extração de contaminantes de preocupação emergente, ou seja, compostos de média a alta polaridade. Quando adicionou-se alginato à superfície da fibra de polipropileno obteve-se uma melhora significativa na eficiência de extração dos compostos investigados. No hidrogel de alginato foi incorporada uma pequena quantidade de zeína. Curiosamente, a blenda de hidrogel foi capaz de extrair com sucesso os compostos com baixa constante de partição octanol/água (K_{ow}), como 17- α -etinilestradiol, progesterona e estriol. Dessa maneira, supõe-se que a absorção inicial de água diminua drasticamente neste gel, desse modo, os grupos hidroxila presentes no alginato e na zeína podem estar disponíveis para interagir com os analitos. O método desenvolvido para a avaliação do dispositivo por GC-MS/MS, apresentou linearidade para o intervalo de LQ ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ a $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, com valores de coeficiente de determinação superiores a 0,99. O método se mostrou com satisfatória exatidão (81,2% a 118,0%), enquanto ensaios de precisão resultaram em desvios padrão entre 1,9% a 22,0%. Esses resultados indicam o potencial da fase/dispositivo para fins quantitativos de analitos em meio ambiente aquoso em intervalos de concentração geralmente descritos na literatura. O método padronizado e validado foi por fim aplicado em matriz real, no caso, amostras de água do rio Belém (Curitiba/PR). Como especial vantagem da fase proposta, destaca-se seu caráter anfifílico, garantindo eficiência de extração tanto para compostos orgânicos de média como de alta polaridade. Por fim, considera-se que esse trabalho fornece um dos primeiros passos para um estudo abrangente sobre o potencial uso do hidrogel como fase seletiva e de baixo custo para sorção de compostos orgânicos.

Palavras-chave: SPME. GC-MS/MS. Hormônios. Cafeína. Micropoluentes orgânicos.

ABSTRACT

In the search for more selective and sensitive chromatographic methods for environmental analysis, the development of new sample preparation techniques, one of the most time consuming and complex analytical procedures, has been widely evaluated. The solid phase microextraction (SPME) has gained prominence over conventional methods, since it minimizes the volume of the sample and the consumption of organic solvents, allows the reuse of the extractive phases, the pre-concentration of the analytes, besides being fast and automation. Although some extractive phases are commercially available for SPME/GC-MS/MS analyzes, the development of new, more selective, stable and low-cost extractive phases has been necessary for the scientific advancement and greater comprehensiveness of the technique. Among the several possible new materials, those based on hydrogels are promising for this application, since the large number of functional groups accredits them for extraction of both polar and less polar compounds. The objective of this study was to synthesize and evaluate a new SPME device, based on alginate hydrogel, for the extraction of contaminants of emerging concern, that is, medium to high polarity compounds. When alginate was added to the surface of the polypropylene fiber there was a significant improvement in the extraction efficiency of the investigated compounds. A small amount of zein was incorporated into the alginate hydrogel. Interestingly, the hydrogel blend was able to successfully extract compounds with a low octanol / water partition coefficient (K_{ow}), such as 17- α -ethynylestradiol, progesterone and estriol. Thus, the initial water uptake is assumed to decrease dramatically in this gel, whereby the hydroxyl groups present in alginate and zein may be available to interact with the analytes. The method developed for the evaluation of the device by GC-MS/MS presented linearity for the range of LQ ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ to $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$) at $100 \mu\text{g L}^{-1}$, with coefficient values higher than 0.99. The method was shown with satisfactory accuracy (81.2% to 118.0%), whereas precision tests resulted in standard deviations between 1.9% and 22.0%. These results indicate the phase/device potential for quantitative purposes of analytes in aqueous environment at concentration ranges generally described in the literature. The standardized and validated method was finally applied in real matrix, in this case, water samples from the Belém river (Curitiba/PR). As a special advantage of the proposed phase, its amphiphilic character is highlighted, guaranteeing extraction efficiency for both medium and high polar organic compounds. Finally, it is considered that this work provides one of the first steps for a comprehensive study on the potential use of the hydrogel as a selective and low cost phase for sorption of organic compounds.

Key-words: SPME. GC-MS/MS. Hormones. Caffeine. Organic micropollutants.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Modos de aquisição em um espectrômetro de massas sequencial (MS/MS) do tipo triplo quadrupolo (QqQ). Q1 e Q3 – primeiro e terceiro quadrupolo; q2 – célula de colisão; CID – colisão induzida por dissociação.....	40
FIGURA 2: Mecanismo geral da reação de sililação, onde X varia de acordo com o tipo de derivatizante utilizado.	45
FIGURA 3: A reação entre o anidrido acético e um álcool para produzir éster de etila e ácido acético.....	46
FIGURA 4: a) Dispositivo comercial para SPME: 1 – Fibra extratora, 2 – Agulha de aço, 3 – Corpo do aplicador, 4 – Septo de silicone, 5 – Guia do aplicador, 6 – Guia do êmbolo, 7 – Êmbolo; b) Representação dos modos de extração SPME: direto (à esquerda) e <i>headspace</i> (à direita).	48
FIGURA 5: Proposta da fórmula estrutural química do íon alginato.....	54
FIGURA 6: Esquema exemplificando a funcionalidade da α -zeína. Em que de R1 a R9 pode-se ter outra molécula ligada, de zeína por exemplo.	55
FIGURA 7: Esquema representando a conjunto <i>labmade</i> SPME.	61
FIGURA 8: Pontos de amostragem na Bacia Hidrográfica do rio Belém.....	73
FIGURA 9: Mecanismo geral da reação de sililação, onde X varia de acordo com o tipo de derivatizante utilizado.	75
FIGURA 10: Cromatograma parcial da análise dos produtos da derivatização da EE2 com o agente derivatizante MSTFA na ausência do catalisador, gerando TMS-E1 e TMS-EE2.....	77
FIGURA 11: a) Cromatograma do produto da reação de EE2 com MSTFA:TMSI (0,1%), b) Espectro de massas do 2TMS-EE2, c) Cromatograma do produto da reação de EE2 com MSTFA:TMSI (1%), d) Espectro de massas do 2TMS-EE2.....	78
FIGURA 12: Espectros de massas representativos de alguns analitos derivatizados: a) IBU; b) 4NP; c) BPA e d) E2.	79
FIGURA 13: a) Corte do cromatograma próximo da região de retenção do analito PRO; b) Espectro de massas da PRO após reação de derivatização (P1) com MSTFA:TMSI 0,1%; c) Espectro de massas da PRO não derivatizada (P2) após reação de derivatização com MSTFA:TMSI 0,1%. Sendo P1 no tempo de 22,54 min e P2 no tempo de 29,63 min.....	80
FIGURA 14: a) Planejamento fatorial 2^3 , onde variou-se a temperatura (40-60°C), tempo (30,0-60,0 min) e volume do agente derivatizante (30-50 μ L); b)	

Planejamento fatorial 2^3 , onde variou-se a temperatura (60-70°C), tempo (20,0-30,0 min) e volume do agente derivatizante (30-50 μL).	84
FIGURA 15: Resposta para cada transição MRM em função da energia de colisão empregada para os compostos IBU, PTM, ATZ, 4OP, CAF, 4NP, BPA, E1 e E2. No eixo x tem-se a energia de colisão (V), no eixo y tem-se a intensidade.	87
FIGURA 16: Resposta para cada transição MRM em função da energia de colisão empregada para os compostos TES, EE2, PRO e E3. No eixo x tem-se a energia de colisão (V), no eixo y tem-se a intensidade.	86
FIGURA 17: Cromatograma no modo de MRM para a energia de colisão (CE) 21V. Sendo os analitos em ordem crescente de tempo de retenção: ibuprofeno (IBU), paracetamol (PTM), atrazina (ATZ), 4-octilfenol (4OP), cafeína (CAF), 4-nonilfenol (4NP), triclosan (TRI), bisfenol A (BPA), estrona, (E1), β -estradiol (E2), testosterona (TES), 17- α -etinilestradiol (EE2), progesterona (PRO) e estriol (E3). ..	88
FIGURA 18: Comparação das áreas dos picos para cada analito com os diferentes tipos de hidrogel suportado na fibra PP. Os analitos estão dispostos em ordem crescente de tempo de retenção. PTM, CAF, TES e PRO tiveram seus valores multiplicados por 10 para melhor visualização.	89
FIGURA 19: Área dos picos após extração de analitos usando fibra PP suportada por hidrogéis na presença e ausência de zeína (n = 3). Os analitos estão dispostos em ordem decrescente de polaridade.	90
FIGURA 20: Superposição de cromatogramas em modo SIM que representa a extração de analitos ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Utilizando Alg:Z tem-se a primeira dessorção, em preto; a segunda dessorção do mesmo dispositivo, em rosa; e após extração líquido-líquido da fase aquosa residual, em azul. Os asteriscos são referentes aos hormônios E1, E2, TES, EE2, PRO e E3, respectivamente.	92
FIGURA 21: Superposição de cromatogramas em modo SIM que representa a extração de analitos ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Utilizando hidrogel de Alg:Z tem-se a primeira dessorção em preto, e utilizando apenas a fibra PP, em rosa.	93
FIGURA 22: a) Gráfico de Pareto e b) superfície de resposta para o composto ibuprofeno obtido no delineamento fatorial 2^3 com configuração em estrela. Sendo A a variável – força iônica, B – temperatura de extração e C – tempo de dessorção.	97
FIGURA 23: Avaliação da etapa de ciclos de dessorção (190 μL de metanol cada).	98

FIGURA 24: Curvas dTG obtidas para o hidrogel de alginato:zeína (Alg:Z), alginato (Alg) e zeína (Z).	100
FIGURA 25: Distância percorrida pela solução de azul de metileno através dos hidrogéis Alg e Alg:Z (n = 3).	100
FIGURA 26: Gráfico da perda de água (% com relação ao peso) dos hidrogéis em duas temperaturas diferentes: 20°C (preto e vermelho) e 4°C (azul e verde), respectivamente (n=3).	101
FIGURA 27: Índice de inchaço (% com relação ao peso) dos hidrogéis Alg:Z e Alg em pH 4 (n = 3).	102
FIGURA 28: Sobreposição dos espectros de infravermelho dos materiais: fibra PP, fibra PP recoberta com o hidrogel de Alg e fibra PP recoberta com o hidrogel Alg:Z.	104
FIGURA 29: Sobreposição dos espectros de infravermelho dos materiais: filme de Alg e filme de Alg:Z.	104
FIGURA 30: Imagens de microscopia eletrônica de varredura: a) fibra PP nua, b) fibra PP com Alg:Z. Ampliação – 55x; c) filme de Alg:Z. Ampliação – 7Kx; d) imagem do hidrogel de Alg:Z suportado na fibra PP. Ampliação – 200x; e) fibra PP com hidrogel de Alg:Z após o procedimento de extração e dessorção. Ampliação – 55x.	106
FIGURA 31: Curvas analíticas extraídas dos analitos IBU, PTM, ATZ, 4OP, CAF e 4NP.	108
FIGURA 32: Curvas analíticas extraídas dos analitos TRI, BPA, E1, E2, TES, EE2, PRO e E3.	109

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Especificações retiradas da literatura e dados experimentais sobre os hormônios esteroidais naturais e sintético investigados nesse trabalho.	31
QUADRO 2: Especificações retiradas da literatura e dados experimentais sobre os produtos farmacêuticos investigados nesse trabalho.	33
QUADRO 3: Especificações retiradas da literatura e dados experimentais sobre a cafeína.	34
QUADRO 4: Especificações retiradas da literatura e dados experimentais sobre os surfactantes investigados neste trabalho.....	35
QUADRO 5: Especificações retiradas da literatura e dados experimentais sobre o bisfenol A.....	36
QUADRO 6: Especificações retiradas da literatura e dados experimentais sobre a atrazina.	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Excreção diária (μg) de estrógenos em humanos.	28
TABELA 2: Revisão de literatura sobre algumas condições de derivatização.	44
TABELA 3: Alguns exemplos de hidrogéis reticulados fisicamente.....	53
TABELA 4: Alguns exemplos de hidrogéis reticulados quimicamente.	53
TABELA 5: Níveis codificados das variáveis do planejamento Plackett-Burman para otimização da etapa de extração e dessorção dos analitos presentes na fibra PP-hidrogel.....	62
TABELA 6: Matriz do delineamento Plackett-Burman com permutagem à esquerda.	63
TABELA 7: Níveis codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^3 com configuração em estrela para otimização da etapa de extração e dessorção dos analitos presentes na fibra PP-hidrogel.....	63
TABELA 8: Matriz do delineamento fatorial 2^3 com configuração em estrela.....	64
TABELA 9: Níveis codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^3 para otimização da reação de derivatização.	66
TABELA 10: Níveis codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^3 para otimização da reação de derivatização.	66
TABELA 11: Condições de análise do GC-MS/MS.	67
TABELA 12: Localização geográfica dos pontos de coleta na bacia hidrográfica do rio Belém.	72
TABELA 13: Parâmetros cromatográficos (GC-MS/MS).	76
TABELA 14: Obtenção da média das áreas ($\times 10^6$) e respectivos desvios padrões ($\times 10^6$) dos picos cromatográficos obtidos com diferentes agentes derivatizantes....	81
TABELA 15: Níveis codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^3 para otimização da reação de derivatização.	83
TABELA 16: Níveis codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^3 para otimização da reação de derivatização.	84
TABELA 17: Dados dos pontos centrais obtidos para a atrazina.....	94
TABELA 18: Valores de área do pico e estudo dos efeitos das variáveis pH de extração, força iônica, tempo de extração (t_{ext}), temperatura de extração (T_{ext}) e tempo de dessorção (t_{dess}) para atrazina.....	95
TABELA 19: Parâmetros de regressão linear e LQ do método SPME-GC-MS/MS proposto.	107

TABELA 20: Parâmetros de precisão e exatidão do método SPME-GC-MS/MS proposto para as amostras feitas em laboratório.	111
TABELA 21: Concentrações dos analitos detectados nos pontos coletados no rio Belém.	113

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 (Perda de água (%))	68
EQUAÇÃO 2 (Grau de intumescimento (%)).....	69
EQUAÇÃO 3 (Erro padrão)	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ξ	Tamanho do poro da rede
ν	Graus de liberdade
$\nu_{2,S}$	Fração volumétrica no inchamento
-COOH	Carboxila
-NH ₂	Amino
=NH	Imino
-OH	Hidroxila
-SH	Tiol
-SO ₃ H	Ácido sulfônico
4NP	4-nonilfenol
4OP	4-octilfenol
AGA	Agarose
ALG	Alginato de sódio
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATZ	Atrazina
BPA	Bisfenol A
BPA_d16	Bisfenol A deuterado
BSTFA	N,O-bis(trimetil-silil)trifluoroacetamida
CAF	Cafeína
CCD	<i>Central composite design</i>
CE	<i>Capillary electrophoresis</i>
CE	Contaminantes emergentes
CE	Energia de colisão
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>

CW	Carbowax
CX	Carboxen
DTGS	Detector de sulfato de triglicina deuterado
DVB	Divinilbenzeno
E1	Estrona
E2	β -estradiol
EE2	17- α -etinilestradiol
E3	Estriol
ECD	<i>Electron capture detector</i>
ef	Eficiência
EI	Ionização por elétrons
Ep	Erro padrão
<i>et al</i>	<i>et alia</i>
ETE	Estação de tratamento de esgoto
eV	Elétron-volt
F	Força iônica
Fibra PP-hidrogel	Fibra de polipropileno-hidrogel
FID	<i>Flame ionization detector</i>
GC	<i>Gas chromatography</i>
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IARC	Agência Internacional de Estudos sobre o Câncer
IBU	Ibuprofeno
IS-ATR	<i>Infrared spectroscopy-attenuated total reflectance</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K _{ow}	Constante de partição octanol/água
Kx	1000 vezes

LC	<i>Liquid chromatography</i>
LD	Limite de detecção
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i>
LQ	Limite de quantificação
m/m	Razão massa/massa
m/v	Razão massa/volume
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
Mc	Massa molar média entre ligações cruzadas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mix	Mistura
MQR/MQr	Média quadrática dos grupos/média quadrática dos resíduos
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MS/MS ou MSn	Espectrometria de massas sequencial ou em tandem
MSTFA	N-metil-N(trimetil-silil) trifluoroacetamida
MTBSTFA	N-ter(butil-dimetil-silil)-N-metiltrifluoroacetamida
n	Número de ensaios
ND	Não detectado
NPD	<i>Nitrogen phosphorus detector</i>
OG	Óxido de grafeno
P1	Progesterona derevatizada
P2	Progesterona não derivatizada
PA	Poliacrilamida
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PE	Ponto de ebulição
PEG 300	Polietileno glicol de massa molar 300 g mol ⁻¹

PEG 4000	Polietileno glicol de massa molar 4000 g mol ⁻¹
pK _a	Logaritmo negativo da constante de acidez
pH _{ext}	pH de extração
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
PP	Polipropileno
PR	Paraná
PRO	Progesterona
PTM	Paracetamol
PVA	Álcool polivinílico
q	Variável inerte
Q	Quadrupolo
Q1	Primeiro quadrupolo
q2	Segundo quadrupolo ou câmara de colisão
Q3	Terceiro quadrupolo
QqQ	Triplo quadrupolo
Q _{Tof}	Quadrupolo-TOF
Q _{trap}	Quadrupolo-ion trap
R1	Radical 1
R1	Rampa 1
R ²	Coeficiente de regressão linear
R2	Rampa 2
R9	Radical 9
RAM	<i>Restrite acess material</i>
RSD	<i>Relative standart deviation</i>
S	<i>South</i>
SI	<i>Swelling index</i>
Si(CH ₃) ₃	Trimetilsilano

SIM	<i>Single ion monitoring</i>
SEM	<i>Scanning electron microscope</i>
SN2	Ataque nucleofílico do tipo dissubstituído
SOD	Superóxido dismutase
SPE	<i>Solid-phase extraction</i>
SPME	<i>Solid-phase microextraction</i>
t	Número da tabela de distribuição de Student
t	Tempo
T	Temperatura
TCD	<i>Thermal conductivity detector</i>
t _{dess}	Tempo de dessorção
TES	Testosterona
t _{ext}	Tempo de extração
T _{ext}	Temperatura de extração
TMS	Trimetilsilano
TMSI	1-(trimetil-silano)imidazol
TOF	<i>Time of flight</i>
TR	Resina TPR-100
TRI	Triclosan
v/v	Razão volume/volume
VI	Variável inerte
W	<i>West</i>
W _{eq}	Massa do hidrogel completamente inchado
W _f	Massa final do hidrogel após hidratação
W _i	Massa do hidrogel seco
W _t	Massa do hidrogel em um dado tempo t
Z	Zeína

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
:	Divisão ou proporção
Σ	Somatório de números

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1	CONTAMINANTES DE PREOCUPAÇÃO EMERGENTE	27
2.1.1	Hormônios	29
2.1.2	Produtos Farmacêuticos.....	32
2.1.3	Estimulantes	33
2.1.4	Surfactantes	34
2.1.5	Plastificantes	35
2.1.6	Pesticidas	36
2.2	MÉTODOS ANALÍTICOS	37
2.2.1	Modos de Aquisição para Obtenção do Espectro de Massas	39
2.2.2	Acoplamento GC-MS/MS para a Determinação de CE	41
2.3	DERIVATIZAÇÃO.....	42
2.4	TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO.....	46
2.5	HIDROGÉIS	49
2.5.1	Estrutura dos Hidrogéis	50
2.5.2	Propriedades Físico-químicas dos Hidrogéis	51
3	OBJETIVOS.....	57
3.1	OBJETIVO GERAL.....	57
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4	MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1	MATERIAIS	58
4.2	MÉTODOS	59
4.2.1	Limpeza de Vidrarias.....	59
4.2.2	Preparo dos Hidrogéis.....	59
4.2.3	Preparo dos Dispositivos de <i>Labmade</i> SPME Contendo Hidrogel	60
4.2.4	Avaliação das Etapas de Extração e Dessorção.....	61
4.2.5	Avaliação da Fase Aquosa Remanescente da Extração	64
4.2.6	Secagem das Amostras	65
4.2.7	Derivatização das Amostras.....	65
4.2.8	Sistema Cromatográfico	66
4.2.9	Caracterização Físico-química do Hidrogel de Interesse	67
4.2.10	Análise dos Parâmetros de Mérito	69

4.2.10.1	Linearidade.....	69
4.2.10.2	Limite de quantificação e limite de detecção	69
4.2.10.3	Precisão	70
4.2.10.4	Exatidão	70
4.2.10.5	Repetibilidade.....	70
4.2.10.6	Reprodutibilidade	71
4.2.10.7	Robustez da fibra	71
4.2.10.8	Estabilidade das soluções	71
4.2.11	Aplicação do Método em Amostras de Águas Superficiais	71
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ETAPA DE DERIVATIZAÇÃO	74
5.2	OTIMIZAÇÃO DAS ENERGIAS DE COLISÕES PARA O MODO MRM	85
5.3	AVALIAÇÃO DOS HIDROGÉIS COMO FASES EXTRATORAS	88
5.4	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO E DE DESSORÇÃO	93
5.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS HIDROGÉIS	99
5.6	ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE MÉRITO.....	106
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....	114
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
	APÊNDICE A	128
	APÊNDICE B	130
	GLOSSÁRIO	132

1 INTRODUÇÃO

A qualidade da água é comumente avaliada quanto aos poluentes microbianos, contaminantes inorgânicos e poluentes orgânicos persistentes (POPs). As determinações em níveis traços de multirresíduos em amostras ambientais (ar, água e solo) são de extrema importância, pois geram valiosos dados para fins de controle de qualidade, ou seja, segurança alimentar, avaliação do risco de exposição funcional, contaminação do meio ambiente, entre outros. Dentre os principais compostos classificados como contaminantes ambientais, estão os denominados contaminantes de preocupação emergente (contaminantes emergentes - CE), caracterizados por serem “compostos químicos novos ou que não possuem regulamentação e que se suspeita causarem efeitos adversos à biota e a saúde humana mesmo presentes no ambiente em baixas concentrações, na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} ” (Farré *et al* (2008) e Pal *et al* (2014)). Assim, é extrema importância mensurar com exatidão e precisão os níveis desses compostos orgânicos em amostras ambientais, em especial em águas superficiais.

Motivada pela demanda de métodos cromatográficos mais seletivos e sensíveis para análises ambientais, o desenvolvimento de novas técnicas de preparo de amostras, uma das etapas mais morosas e complexas dos procedimentos analíticos, tem sido amplamente avaliado. Nos últimos anos, as recentes técnicas miniaturizadas de preparo de amostras para determinações cromatográficas, como a microextração em fase sólida (do inglês *solid-phase microextraction* – SPME) (Arthur; Pawliszyn (1990)), tem ganhado destaque frente aos métodos convencionais, pois minimizam o volume da amostra e o consumo de solventes orgânicos, permitem a reutilização das fases extratoras, a pré-concentração dos analitos, além de serem rápidos e passíveis de automação.

Apesar de algumas fases extratoras estarem disponíveis no comércio para as análises por SPME, o desenvolvimento de novas fases extratoras mais seletivas, estáveis e de baixo custo, tem sido necessário para o avanço científico e maior abrangência da técnica. Dentre os diversos possíveis novos materiais, aqueles baseados em hidrogéis se mostram promissores para esta aplicação, pois o grande número de grupos funcionais como hidroxila ($-\text{OH}$), carboxila ($-\text{COOH}$), ácido sulfônico ($-\text{SO}_3\text{H}$) e amina ($-\text{NH}_2$) presentes em suas estruturas poliméricas os credenciam para extração, tanto de compostos polares quanto menos polares. Além disso, tais materiais apresentam estabilidade química e física na presença de solventes orgânicos e estabilidade mecânica necessária para a utilização em SPME.

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma nova fase extratora baseada em hidrogéis de alginato e zeína para aplicação em SPME e determinação cromatográfica, via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, de

contaminantes emergentes diversos em amostras aquosas, para fins de avaliação de viabilidade e futuro controle de qualidade. Os compostos de interesse para este estudo incluem hormônios naturais (β -estradiol (E2), estriol (E3), estrona (E1), progesterona (PRO) e testosterona (TES)), um hormônio sintético (17- α -etinilestradiol (EE2)), alguns produtos farmacêuticos (ibuprofeno (IBU), paracetamol (PTM) e triclosan (TRI)), um produto estimulante utilizado em grande escala (caféina (CAF)), alguns detergentes (4-nonilfenol (4NP) e 4-octilfenol (4OP)), um plastificante (bisfenol A (BPA)) e um pesticida (atrazina (ATZ)).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTAMINANTES DE PREOCUPAÇÃO EMERGENTE

Através da industrialização, urbanização e outras mudanças sociais houve o avanço da expectativa de vida da população e por consequência uma exigência por melhor qualidade de vida, imposta principalmente por meio de certificados de qualidade de órgãos regulamentadores, nacionais e internacionais. Tais instituições têm requerido um melhor controle sobre o meio ambiente, alimentos, administração de medicamentos e outros fatores.

Como parte do meio ambiente tem-se a água, que é um produto natural essencial tanto para os seres humanos quanto para qualquer outra forma de vida. Seu uso é indispensável para o desenvolvimento econômico e é um dos recursos que mantêm em equilíbrio os ecossistemas do nosso planeta. Neste sentido é preciso haver consciência de que há uma limitação natural da quantidade da água doce disponível para ser utilizada como potável para os seres vivos, assim como de sua qualidade. A poluição da água é a contaminação dos corpos d'água por elementos físicos, químicos e biológicos que podem ser nocivos ou prejudiciais aos organismos, plantas e à atividade humana.

Dentre os principais produtos classificados como contaminantes ambientais estão os denominados contaminantes de preocupação emergente (CE), como já citado. Assim sendo, o monitoramento dessas substâncias residuais no meio ambiente vem crescendo devido ao fato de muitos desses compostos serem frequentemente encontrados em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) e águas naturais (Bila e Dezotti (2003) e Deblonde *et al* (2011)). Dentre essas substâncias estão inclusos alguns fármacos de diferentes classes e usualmente empregados como analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos de uso veterinário e humano, hormônios e esteroides, além de componentes presentes em protetores solares, produtos de higiene pessoal como fragrâncias contendo grupos nitro e ftalatos, inseticidas, repelentes e anti-sépticos (Daughton; Ternes (1999); Zhou *et al* (2007) e Bahram *et al* (2011)).

Atualmente, sabe-se pouco sobre os efeitos destes CE em águas, embora muitos deles sejam classificados como interferentes endócrinos, ou seja, substâncias ou misturas exógenas que alteram a função do sistema endócrino e, consequentemente, causam efeitos adversos em um organismo saudável, ou em seus descendentes ou subpopulações (Bila; Dezotti (2007) e Figueiredo (2014)). Neste sentido, nos últimos anos, atenção especial tem sido dada à presença destes contaminantes em mananciais utilizados para o abastecimento público, bem como para a água distribuída à população após tratamento. No Brasil esta questão tem importância devido à carência de políticas

públicas sobre o tema, bem como, aos baixos índices de tratamento de esgoto, principal vetor de contaminação de águas superficiais e subterrâneas utilizadas como fontes de abastecimento público.

Muitos CE ainda não são contemplados em legislações ambientais pelo mundo. Apenas alguns compostos isolados vêm sendo regulamentados, embora a grande maioria ainda permaneça sem definições legais quanto sua presença em diferentes matrizes. Ao mesmo tempo, diversos trabalhos têm abordado o problema em questão, tanto a presença destes contaminantes quanto seus efeitos crônicos sobre organismos vivos. Este interesse tem impulsionado, em muitos países, ações governamentais e não governamentais que buscam definir parâmetros universais de debate sobre o tema, incluindo a minimização de substâncias químicas e o estabelecimento de normas e condutas (Becker (2012)).

Os produtos farmacêuticos, principalmente os situados nas classes dos hormônios, antibióticos, analgésicos, anticonvulsivantes e reguladores lipídicos são constantemente investigados em matrizes aquosas, como águas de rio (Bagheri *et al* (2004); Ruhí A., *et al* (2015)), oceânicas (Braga *et al* (2005)) e águas de abastecimento público (Pal *et al* (2014)). No conjunto de substâncias classificadas como CE, destaque pode ser dado àqueles compostos com potencial de causar desregulação endócrina, como os hormônios e as substâncias que tendem a causar mutação estrogênica, como o bisfenol A (BPA), 4-nonilfenol (4NP) e 4-octilfenol (4OP), por exemplo (Quintana *et al* (2004)).

A principal rota de entrada dos hormônios no meio ambiente é através do consumo e da excreção humana e animal desses contaminantes. Nos seres vivos, os chamados hormônios sexuais naturais são eliminados na urina e nas fezes, como observa-se na TABELA 1, referente à massa média de hormônios excretados diariamente pela população.

TABELA 1: Excreção diária (μg) de estrógenos em humanos.

Categorias	E1	E2	EE2	E3
Homens	3,9	1,6	-	2,5
Mulheres durante o ciclo menstrual normal	8,0	3,5	-	5,8
Mulheres na menopausa	4,0	2,3	-	1,0
Mulheres grávidas	600	259	-	6000
Mulheres que ingerem anticoncepcional oral	-	-	35	-

Sendo E1 – estrona; E2 – β -estradiol; EE2 – 17- α -etinilestradiol; E3 – estriol.

Fonte: Adaptado de Dallegrave (2012).

A maior fração dos hormônios naturais é eliminada na forma conjugada (glicoronizados ou sulfatados), sendo, portanto, inativos. Já a forma livre é ativa

(Dallegrave (2012). Os estudos observados na literatura, de um modo geral, se concentram em quantificar os hormônios livres, que representam a forma ativa.

Na sequência, será apresentada uma breve discussão sobre os principais compostos de cada uma das classes de interesse deste estudo, no que se refere à contaminação de água naturais. Os analitos, em sua grande maioria, são utilizados como medicamentos ou estão envolvidos no consumo diário, sendo muitas vezes indiscriminados pela população. Estas mesmas substâncias, de acordo com estudos, causam algum tipo de dano ao meio ambiente e por isso foram ponto de partida para o desenvolvimento desta pesquisa.

2.1.1 Hormônios

Os hormônios são definidos como substâncias produzidas por glândulas endócrinas que são liberadas na corrente sanguínea e atuam sobre tecidos-alvo com o objetivo de ligar-se a receptores específicos. São responsáveis pelas mais variadas funções, atuando desde o crescimento de uma pessoa até a regulação de sua capacidade reprodutiva, seu comportamento e seu metabolismo (Annamalai; Namasivayam (2015)).

Dentro da classe dos hormônios existem os hormônios esteroidais, que são compostos biologicamente ativos, sintetizados a partir do colesterol, classificados em esteroides sexuais e corticoesteróides, de acordo com sua atividade biológica e efeito farmacológico (Braga *et al* (2005)). Neste trabalho, aborda-se o grupo dos esteroides sexuais, tanto naturais quanto sintéticos, que são os hormônios responsáveis pela reprodução, desenvolvimento das características secundárias femininas e masculinas, além do funcionamento de diversos órgãos (Braga *et al* (2005)).

- β -estradiol (E2): Substância responsável pelas características sexuais femininas secundárias e pela menstruação normal. Na fase da menopausa sua concentração sanguínea cai consideravelmente, dessa maneira é o principal estrogênio utilizado no tratamento de perturbações da menopausa. No corpo humano, sofre metabolização principalmente no fígado, sendo a E1 e o E3 seus principais metabólitos (Dallegrave (2012)). Entre outras funções, é responsável pela manutenção dos tecidos do organismo garantindo a elasticidade da pele e dos vasos sanguíneos, além de auxiliar na reconstrução óssea. A sua utilização também tem sido proposta para a prevenção de doenças cardiovasculares (Lima (2013)). Segundo dados da literatura, em concentrações de 1 a 10 ng L⁻¹ pode provocar a feminização de algumas espécies de peixes e, por

consequência, causar problemas de reprodução da espécie (Dallegrave (2012) e Lima (2013)).

- Estriol (E3): Estrógeno sintetizado durante a gravidez e pode ser originado pelo metabolismo do E2 e da E1. Também é amplamente utilizado na reposição hormonal na fase da menopausa, uma vez que induz a normalização do epitélio vaginal, cervical e uretral, ajudando na restauração da microflora normal e no pH fisiológico da vagina. Além disso, aumenta a resistência das células com relação às inflamações e infecções (Dallegrave (2012) e Lima (2013)).

- Estrona (E1): Presente naturalmente na circulação sanguínea das mulheres, mas na fase da menopausa sofre um aumento de concentração e sua maior parte está conjugada sob a forma de sulfato. Atualmente, é muito utilizada para avaliação do hipogonadismo, da puberdade precoce (completa ou parcial), de diagnóstico de tumores feminilizantes e do acompanhamento de reposição hormonal na menopausa (Lima (2013)).

- Progesterona (PRO): Hormônio produzido principalmente no ovário, sendo fundamental para a manutenção da gravidez. Muitos progestogênios apresentam possibilidade de efeito carcinogênico em humanos, segundo a Agência Internacional de Estudos sobre o Câncer (IARC) (Dallegrave (2012)).

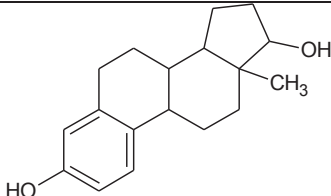
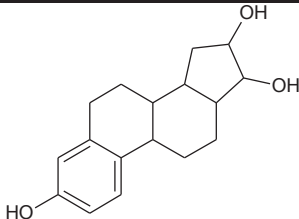
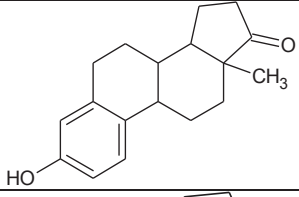
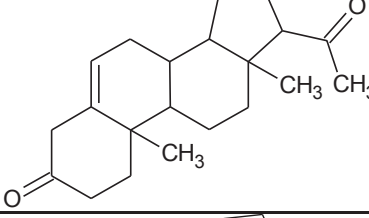
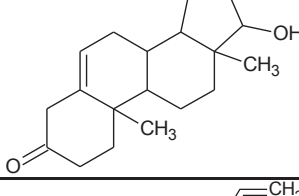
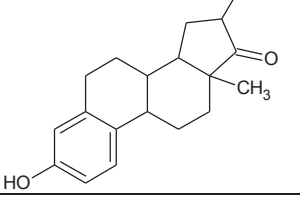
- Testosterona (TES): É produzida em grande quantidade no corpo do homem de idade adulta a níveis de 8,0 mg por dia. Em estudos terapêuticos, são utilizados em diferentes estados de tratamentos de hipogonadais masculinos e oligoespermia. Outro destino que esse hormônio frequentemente segue é na utilização como anabolizantes para homens e mulheres (Valadares (2007)).

- 17- α -etinilestradiol (EE2): Composto utilizado em pílulas contraceptivas, que varia sua concentração entre 15 e 50 μ g por pílula por dia (Lima (2013)). Outra função é ser utilizado na engorda ilícita de gado (Dallegrave (2012)). Esse composto possui grande potencial endócrino e é excretado na urina de seres vivos que usam os contraceptivos diariamente. Estudos comprovaram que a exposição de animais aquáticos ao EE2 causam mudanças no fenótipo, como falha nos órgãos reprodutivos, formação de hermafroditas e aumento na produção da proteína vitelogenina (proteína sintetizada pelas fêmeas durante a maturação ócito). O uso desse medicamento possui muitos pontos negativos, e entre os mais graves, o desenvolvimento e evolução de câncer de mama.

Devido a esses fatos, há a preocupação em avaliar a remoção desse contaminante das ETEs, uma vez que os efluentes vão para rios e mananciais e podem chegar ao consumo humano (Becker (2012); Dallegrave (2012) e Lima (2013)).

Em seguida, é apresentado o QUADRO 1 em que pode-se observar algumas características físico-químicas dos hormônios estereoidais naturais e sintético discutidos nesse trabalho, além de suas fórmulas estruturais.

QUADRO 1: Especificações retiradas da literatura e dados experimentais sobre os hormônios esteroidais naturais e sintéticos investigados nesse trabalho.

Sigla do analito	Fórmula estrutural	MM (g mol ⁻¹)*	Solubilidade em água (g L ⁻¹ à 25°C)*	PE (°C)*	Log K _{ow} *	pK _a *
E2		272	13,0 x 10 ⁻³	258-260	4,01	10,33
E3		288	32,0 x 10 ⁻³	469	2,45	10,54
E1		270	13,0 x 10 ⁻³	445,2	3,13	10,33
PRO		314	15,0 x 10 ⁻³	496,4	3,87	18,92
TES		288	15,0 x 10 ⁻³	450	3,32	19,09
EE2		296	4,8 x 10 ⁻³	-	3,67	10,52

*Farmacopeia do Brasil (2010).

Sendo MM – massa molar; K_{ow} – constante de partição octanol/água; pK_a – logaritmo negativo da constante de acidez; E1 – estrona; E2 – β -estradiol; EE2 – 17- α -etinilestradiol; E3 – estriol; PRO-progesterona; TES – testosterona.

2.1.2 Produtos Farmacêuticos

Produtos farmacêuticos são, tecnicamente, obtidos ou elaborados com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. São todas as substâncias ou associações de substâncias apresentadas como possuidoras de propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos, com o objetivo de estabelecer um tratamento para o diagnóstico médico ou, exercer uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas (Sacher *et al* (2001)).

Neste trabalho, serão avaliados três compostos amplamente utilizados pela população mundial com e sem prescrição médica, ou seja, produtos farmacêuticos que não possuem um controle rígido dos órgãos regulamentadores.

- Ibuprofeno (IBU): Utilizado como agente anti-inflamatório, empregado para reduzir a inflamação, febre e dor. Seu uso prolongado provoca diversos efeitos colaterais como úlceras gastrointestinais, hemorragias e disfunção renal, além de efeitos no sistema nervoso. Outras implicações podem incluir diarreia, vômitos, constipação, tontura, nervosismo, prurido, depressão, sonolência e insônia (Colaço (2013); Geraldo (2013) e Peres (2014)).

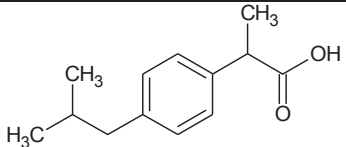
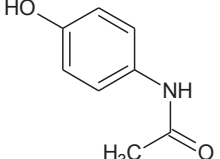
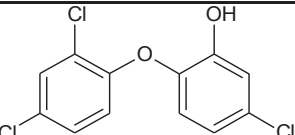
- Paracetamol (PTM): O fármaco é conhecido como o mais usado no tratamento de febre (antipirético) e dor (analgésico) no mundo. É indicado no tratamento de síndromes gripais ou outras hipertermias infecciosas; reações à vacinação; cefaleias; enxaquecas; dores de dentes, ouvidos, menstruais, traumáticas, musculares e articulares; e como analgésico antes e após intervenções cirúrgicas. O composto não apresenta efeitos secundários graves, mas quando esses ocorrem estão relacionados aos efeitos hepatotóxicos, ou seja, males do fígado. Geralmente, ocorrem com a sobredosagem de pacientes onde as vias de glucuronidação e sulfonação ficam saturadas, podendo originar danos hepáticos (Ferreira (2010)).

- Triclosan (TRI): Agente bactericida de ação antimicrobiana, cujo principal sítio de ação é a membrana citoplasmática da bactéria (Garcia (2011)). É encontrado em diversos produtos de higiene pessoal (xampus, sabões, cremes, pastas dentífricas, desodorantes e outras) devido suas propriedades antissépticas. Na medicina é utilizado devido suas características anti-inflamatórias, inibindo a formação de placa bacteriana. Na indústria, é empregado como aditivo em embalagens de alimentos para prevenir o

crescimento de microorganismos e estender a vida útil do polímero (Garcia (2011) e Newton. (2006)). No meio ambiente pode causar grandes impactos por ser considerado um antibiótico sintético forte, também analisado como um pesticida. De acordo com pesquisas recentes, apresenta possíveis efeitos de aberrações cromossômicas (Garcia (2011)).

Cada um dos produtos farmacêuticos apresentados está inserido no QUADRO 2, em que pode-se observar algumas características físico-químicas além de suas fórmulas estruturais. Estes compostos podem ser potenciais causadores de danos ao meio ambiente, como diminuição de espécies de bactérias, por exemplo (Loos *et al* (2010)).

QUADRO 2: Especificações retiradas da literatura e dados experimentais sobre os produtos farmacêuticos investigados nesse trabalho.

Sigla do analito	Fórmula estrutural	MM (g mol ⁻¹)*	Solubilidade em água (g L ⁻¹ à 25°C)*	PE (°C)*	K _{ow} *	pK _a *
IBU		206	1,1 x 10 ⁻²	157	3,97	4,91
PTM		151	14,3 x 10 ⁻³	>500	0,46	9,38
TRI		289	10,0 x 10 ⁻³	280-290	4,76	7,90

*Farmacopeia do Brasil (2010).

Sendo MM – massa molar; K_{ow} – constante de partição octanol/água; pK_a – logaritmo negativo da constante de acidez; IBU – ibuprofeno; PTM – paracetamol; TRI – triclosan.

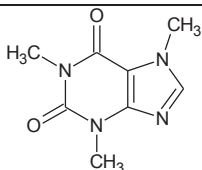
2.1.3 Estimulantes

No passado os estimulantes eram prescritos para o tratamento da obesidade, hoje são utilizados para tratamentos neurológicos, pois demonstram ter efeitos como a melhora do estado de alerta e sensação de bem estar. Dessa maneira, o aumento da prescrição médica, o abuso e mau uso dessa classe de compostos levam a preocupações de saúde pública, pois a utilização de estimulantes pode levar à insuficiência cardíaca, hipertensão pulmonar, hipertermia, convulsões, acidente vascular cerebral, hepatotoxicidades e distúrbios psiquiátricos (Zemolim (2015)).

• **Cafeína (CAF):** Estimulante suave e também conhecido como a droga psicoativa mais consumida no mundo. Aumenta ligeiramente a atividade neural de várias regiões do cérebro. Dentro do corpo, é absorvida pelo trato digestivo e seu consumo excessivo causa danos a esses tecidos (Becker (2012)). Embora uma parcela pequena da população consuma cafeína na forma de fármacos, em antigripais, grande parte deste alcaloide é ingerido na forma de bebidas (Lima (2013)). A cafeína já foi encontrada em níveis superiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ em água disponível para consumo humano, demonstrando assim que a substância pode ser considerada como um marcador químico antropológico adequado para verificar a contaminação de águas superficiais por águas residuais (Becker (2012)).

As características físico-químicas da cafeína além de sua fórmula estrutural estão presentes no QUADRO 3.

QUADRO 3: Especificações retiradas da literatura e dados experimentais sobre a cafeína.

Sigla do analito	Fórmula estrutural	MM (g mol^{-1})*	Solubilidade em água (g L^{-1} à 25°C)*	PE ($^\circ\text{C}$)*	K_{ow} * [*]	pK_a * [*]
CAF		194	$0,2 \times 10^{-2}$	178	0,07	10,00

*Farmacopeia do Brasil (2010).

Sendo MM – massa molar; K_{ow} – constante de partição octanol/água; pK_a – logaritmo negativo da constante de acidez; CAF – cafeína.

2.1.4 Surfactantes

Surfactantes, também conhecidos como tensoativos, são substâncias utilizadas para a limpeza em geral, pois conseguem “envolver” substâncias e retirá-las junto com a água, através de um processo chamado emulsificação. Analisando melhor a estrutura dessas substâncias, vemos que elas são constituídas por longas cadeias carbônicas hidrofóbicas com um grupo hidrofílico em uma de suas extremidades. Essa propriedade permite ao surfactante interagir tanto com substâncias polares (água) quanto com as menos polares (Peres (2014)).

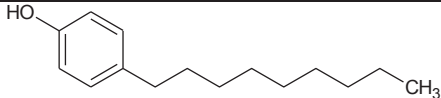
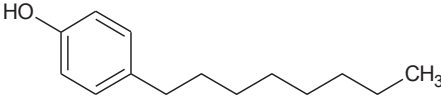
• **4-nonilfenol (4NP):** Surfactante não iônico usado na formulação de detergentes de uso industrial e doméstico, também é utilizado na produção de resinas fenólicas, na preparação de lubrificantes, plastificantes, aditivos de óleos, antioxidantes para borrachas e plásticos, emulsificantes, agentes umidificantes e em formulações de agrotóxicos

(Figueiredo (2014) e Lima (2013)). Na literatura são considerados como desreguladores endócrinos, podendo acumular-se nos músculos de peixes quando estes são expostos a efluentes contendo este microcontaminante (Lima (2013) e Liu *et al* (2012)).

• 4-octilfenol (4OP): A principal ocorrência desses compostos no meio aquático é proveniente do uso doméstico como surfactante. Suas características pertinentes à desregulamentação endócrina se comparam ao do 4NP (Lima (2013)).

Algumas características físico-químicas e as fórmulas estruturais dos surfactantes investigados estão presentes no QUADRO 4.

QUADRO 4: Especificações retiradas da literatura e dados experimentais sobre os surfactantes investigados neste trabalho.

Sigla do analito	Fórmula estrutural	MM (g mol ⁻¹)*	Solubilidade em água (g L ⁻¹ à 25°C)*	PE (°C)*	K _{ow} *	pK _a *
4NP		220	3,0 x 10 ⁻³	304	5,76	10,71
4OP		206	3,0 x 10 ⁻³	300	5,10	10,31

*Farmacopéia do Brasil (2010).

Sendo MM – massa molar; K_{ow} – constante de partição octanol/água; pK_a – logaritmo negativo da constante de acidez; 4NP – 4-nonilfenol; 4OP – 4-octilfenol.

2.1.5 Plastificantes

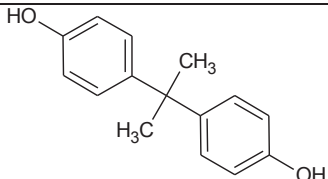
Plastificantes são aditivos que suavizam os materiais, normalmente misturas de plástico e cargas inorgânicas. Ainda que, se usem os mesmos compostos para plásticos, que para concretos, os efeitos são ligeiramente diferentes. Os plastificantes para plásticos suavizam o produto final incrementando sua flexibilidade. Os plastificantes para concreto suavizam a mistura antes que cure, fazendo-o mais trabalhável, sem afetar às propriedades finais do produto, uma vez endurecido (Munaretto (2012)).

O desenvolvimento da tecnologia ampliou a variabilidade de materiais com as características adequadas para suprir a grande diversidade de embalagens que se faz necessária nos dias de hoje (Barros (2010)). Dessa maneira, a quantidade de lixo que é gerado é cada vez maior, sendo um dos destinos para esses materiais as águas de rios e oceanos. Com a degradação dos produtos muitos compostos entram em contato com seres vivos, podendo causar efeitos adversos.

• Bisfenol A (BPA): Monômero de plástico utilizado na produção de policarbonato (substância que dá origem a copos, mamadeiras e garrafas), resinas epóxi, polisulfona, poliacrilato, polieterimida, poliéster insaturado e fenólicos (Lima (2013)). As resinas epóxi reúnem propriedades protetoras contra a corrosão, têm estabilidade térmica e resistência mecânica. O composto é utilizado principalmente em revestimentos com inúmeras aplicações industriais e de consumo, como embalagens de alimentos e bebidas, selantes dentários, esmaltes, revestimentos protetores para uso automobilístico e náutico e na fabricação de turbinas eólicas (Figueiredo (2014) e Lima (2013)). Devido sua ampla utilização, a população humana entra facilmente em contato com o BPA diariamente, que é conhecido por possuir propriedades estrogênicas. Tal composto tem sido relatado como sendo mimetizador estrogênico, esse efeito pode explicar doenças como endometriose, hiperplasia do endométrio, câncer nos ovários, nos testículos e na próstata, redução de esperma, alteração na região reprodutiva da fêmea, além de poder estar associado a abortos espontâneos, alterações nas funções de imunidade e diminuição de fertilidade em pássaros, peixes e mamíferos (Figueiredo (2014) e Lima (2013)).

No QUADRO 5 pode-se observar algumas características físico-químicas, além da fórmula estrutural do BPA.

QUADRO 5: Especificações retiradas da literatura e dados experimentais sobre o bisfenol A.

Sigla do analito	Fórmula estrutural	MM (g mol ⁻¹)*	Solubilidade em água (g L ⁻¹ à 25°C)*	PE (°C)*	K _{ow} *	pK _a *
BPA		228	30,0 x 10 ⁻²	398	3,32	10,20

*Farmacopéia do Brasil (2010).

Sendo MM – massa molar; K_{ow} – constante de partição octanol/água; pK_a – logaritmo negativo da constante de acidez; BPA – bisfenol A.

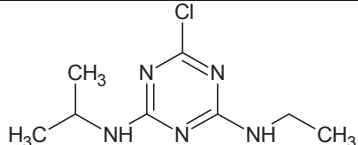
2.1.6 Pesticidas

Também conhecidos como praguicidas, são todas as substâncias ou misturas que têm como objetivo impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga. Sobre os pesticidas químicos, essas substâncias são lançadas de encontro às pragas que estiverem destruindo uma plantação ou disseminando doenças e acabam entrando no meio ambiente aquático através da lixiviação. Não são necessariamente venenos, porém, quase sempre, são tóxicos ao ser humano (Tomkins; Ilgner (2002)).

• Atrazina (ATZ): Herbicida utilizado no controle de plantas daninhas na cultura do milho, sorgo, cana-de-açúcar, soja, entre outras (Bonfleur (2010) e Cappellini (2008)). Atua através da inibição da fotossíntese, onde age como inibidora do transporte de elétrons. É considerada como moderadamente tóxica e pode causar danos ao DNA de organismos aquáticos e imunotoxicidade. Estudos revelam que esse composto altera a função endócrina de humanos, com efeito estrogênico fraco e inibição de hormônios andrógenos. Além disso, é uma substância tóxica para gestantes, pois tem capacidade de atravessar a placenta e afetar o crescimento fetal (Fernandes (2014)).

Estão presentes no QUADRO 6 algumas características físico-químicas da atrazina, além de sua fórmula estrutural.

QUADRO 6: Especificações retiradas da literatura e dados experimentais sobre a atrazina.

Sigla do analito	Fórmula estrutural	MM (g mol ⁻¹)*	Solubilidade em água (g L ⁻¹ à 25°C)*	PE (°C)*	K _{ow} *	pK _a *
ATZ		215	33,0 x 10 ⁻³	205	2,61	1,60

*Farmacopéia do Brasil (2010).

Sendo MM – massa molar; K_{ow} – constante de partição octanol/água; pK_a – logaritmo negativo da constante de acidez; ATZ – atrazina.

Diante de tudo que foi apresentado, percebe-se a importância de investigar e quantificar esses contaminantes ambientais, que mesmo em concentrações traço, suspeita-se causarem efeitos irreparáveis à saúde humana e à biota em geral.

2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

O avanço de tecnologias, especialmente as baseadas em técnicas de separação cromatográfica, como a cromatografia líquida (*liquid chromatography* – LC), a cromatografia gasosa (*gas chromatography* – GC) e a eletroforese capilar (*capillary electrophoresis* – CE), tem permitido a determinação de uma ampla gama de compostos e possibilitado uma avaliação mais abrangente dos contaminantes ambientais (Ruhí A. *et al* (2015)). O aumento da conscientização da população de que contaminantes ambientais são um risco para a saúde tem impulsionado o desenvolvimento de metodologias mais sensíveis e confiáveis para exploração e divulgação de seus resultados. Nesse sentido, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (*gas chromatography-mass spectrometry* – GC-MS) tem se destacado devido ao seu alto poder de resolução, capacidade de atingir menores limites de detecção, quando

comparada aos detectores mais clássicos, e sofrer menor influência do efeito de matriz em comparação com a LC.

A GC é uma técnica de separação que baseia-se na diferente distribuição de substâncias presentes na amostra, de acordo com a polaridade e volatilidade de cada substância, entre uma fase estacionária (coluna cromatográfica) e a fase móvel (gás), sendo esta técnica aplicada a análise de compostos voláteis ou volatilizáveis, e termicamente estáveis. Após serem separadas na coluna cromatográfica, as substâncias analisadas chegam a um sistema de detecção apropriado. Diversos detectores têm sido acoplados à GC, a saber: detector por condutividade térmica (*thermal conductivity detector* – TCD); detector por ionização em chama (*flame ionization detector* – FID); detector por captura de elétrons (*electron capture detector* – ECD) e detector de nitrogênio e fósforo (*nitrogen phosphorus detector* – NPD) (Munaretto (2012)). Porém, pela alta detectabilidade e geração de informações estruturais dos analitos e interferentes, fornecidas pelo espectro de massas, o detector de espectrometria de massas (*mass spectrometry* – MS) tem sido amplamente utilizado nas determinações de compostos orgânicos.

Neste sentido, o desenvolvimento de espectrômetros de massas de múltiplos estágios, como o do tipo triplo quadrupolo (QqQ), permite o acesso a técnicas de espectrometria de massas sequencial ou em tandem (MS/MS ou MSⁿ), garantindo um aumento significativo das potencialidades analíticas da técnica, em especial no que se refere à seletividade analítica e sensibilidade. As análises de íons pré-selecionados, formados através de processos de dissociação ou reações íon/molécula, permitem a obtenção de informações mais detalhadas quando comparadas àquelas obtidas através de espectros de massas simples. Portanto, com as técnicas de MS/MS obtém-se não somente a razão massa/carga (m/z) dos íons, mas também, informações estruturais de cada um desses íons, permitindo, portanto, a “reconstrução” da molécula precursora (Schalley (2000) e Hoffmann; Stroobant (2007)). O modo escolhido para aquisição de dados na GC-MS/MS está diretamente relacionado à seletividade e sensibilidade do método. Dentre os diferentes modos de aquisição possíveis neste sistema, existem três modos que são de maior aplicabilidade (ver FIGURA 1), sendo eles o de varredura total de íons (do inglês, *full scan*), para análises de escaneamento, o de monitoramento seletivo de íons (do inglês, *single ion monitoring* – SIM), para análises seletivas, e o de monitoramento de reações múltiplas (do inglês, *multiple reaction monitoring* – MRM), para análises com caráter de especificidade.

O princípio básico da MS é a geração de íons de compostos orgânicos ou inorgânicos e a separação através da sua razão massa/carga (m/z), seguida da detecção qualitativa e quantitativa da respectiva m/z e abundância. A estrutura clássica de um

espectrômetro de massas consiste, basicamente, na introdução da amostra, em uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector (Hoffmann; Stroobant (2007)).

Primeiramente, a amostra, no caso do acoplamento com GC, é enviada já na sua forma volatilizada ao espectrômetro de massas através do acoplamento da saída da coluna cromatográfica com a fonte de ionização do sistema, em alto vácuo. A fonte de ionização é um dispositivo que promove a ionização dos analitos da amostra antes da sua entrada no analisador de massas. Existe uma grande variedade de técnicas de ionização, cuja escolha deve levar em conta as propriedades físico-químicas do analito e a energia transferida durante o processo de ionização. Para cromatografia gasosa, a fonte de ionização mais utilizada é a de ionização por elétrons (EI), onde um feixe de elétrons, geralmente com energia de 70 eV, bombardeia a amostra convertendo os analitos em íons com m/z igual a sua massa molecular. Neste modo de ionização, pela alta energia aplicada, considerável fragmentação dos compostos orgânicos em íons de m/z menores é evidenciada. Esta fragmentação, e a consequente geração de um espectro de massas em condições determinadas, pode ser utilizada para as análises qualitativas em GC-MS, além dos tempos de retenção na separação cromatográfica (Dos Santos Pereira; De Aquino Neto (2000); Hoffmann; Stroobant (2007)).

Após serem gerados na fonte de ionização, os íons são transferidos para uma região do equipamento, conhecida como analisador de massas, onde sua razão m/z é medida. Os principais tipos de analisadores utilizados são: quadrupolo (Q), aprisionamento de íons (do inglês, *ion trap*) e tempo de voo (do inglês, *time of flight* – TOF). Além disso, configurações híbridas como triplo quadrupolo (QqQ), quadrupolo-TOF (Q_{TOF}), quadrupolo-*ion trap* (Q_{trap}) e alguns outros podem ser empregados.

O analisador do tipo quadrupolo é o analisador com maior relação custo-benefício entre os citados, utiliza campos elétricos oscilantes, gerados por quatro barras metálicas (eletrodos), para estabilizar ou desestabilizar seletivamente os íons durante sua passagem pelo centro do quadrupolo, de acordo com seus valores de m/z . O quadrupolo funciona como um filtro, permitindo que os íons de diferentes valores de m/z cheguem com tempos diferentes ao detector e, desta forma, poderem ser diferenciados e, portanto, selecionados (Schalley (2000)).

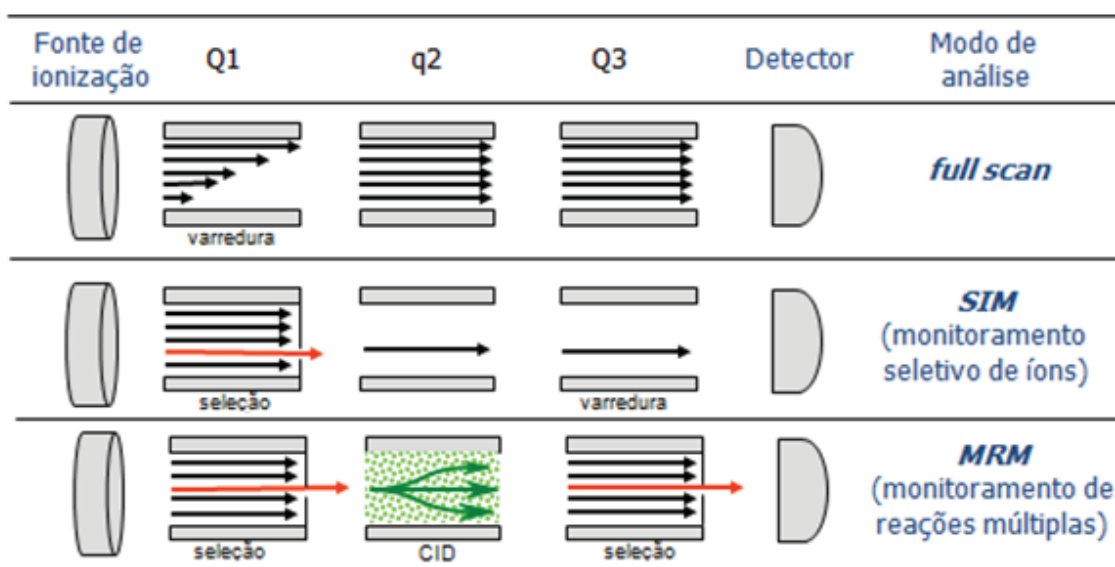
2.2.1 Modos de Aquisição para Obtenção do Espectro de Massas

O desenvolvimento dos espectrômetros de massas de múltiplos estágios, como o do tipo triplo quadrupolo, permitiu o acesso a técnicas de MS/MS e, com isso, ocorreu um aumento significativo das potencialidades analíticas da técnica. As análises de íons pré-selecionados, formados através de processos de dissociação ou reações íon/molécula,

permitiram a obtenção de informações mais detalhadas quando comparadas àquelas obtidas através de espectros de massas simples. Com técnicas de MS/MS obtém-se não somente a razão m/z dos íons, mas também, informações estruturais de cada um desses íons, permitindo, portanto, a “reconstrução” da molécula precursora (Schalley (2000); Hoffmann; Stroobant (2007)).

Na FIGURA 1 é representado o esquema geral de um analisador do tipo QqQ, no qual o primeiro e o terceiro quadrupolo (Q1 e Q3) são utilizados para realizar a varredura ou seleção dos íons. O segundo quadrupolo, ou câmara de colisão (q2), é utilizado para realizar a fragmentação induzida por colisão com o gás de colisão (argônio, por exemplo) dos fragmentos precursores gerados na etapa de ionização. Desta maneira, são gerados fragmentos produtos que podem ser selecionados ou focalizados em Q3.

FIGURA 1: Modos de aquisição em um espectrômetro de massas sequencial (MS/MS) do tipo triplo quadrupolo (QqQ). Q1 e Q3 – primeiro e terceiro quadrupolo; q2 – célula de colisão; CID – colisão induzida por dissociação.



FONTE: Adaptado de Dallegrave (2012).

No modo **full scan**, a aquisição é realizada de forma a se obter uma varredura completa de todos os íons formados na ionização durante todo o tempo da corrida cromatográfica, dentro da faixa de m/z estipulada, conforme se observa na FIGURA 1. Este tipo de varredura é muito comum quando se tem, como analisador, um único quadrupolo, mas também é utilizado quando se tem um sistema sequencial, ou seja, MS/MS. Neste caso, pode-se utilizar Q1 como analisador no modo de varredura e q2 e Q3 como focalizadores, transmitindo os íons ao detector (Dallegrave (2012) Munaretto (2012)).

Já no modo **SIM**, são selecionados íons de interesse, em determinados tempos de aquisição, coincidentes com os analitos de interesse, conforme a FIGURA 1. O modo

SIM é muito utilizado quando se tem apenas um quadrupolo, mas, do mesmo modo, pode ser utilizado no sistema QqQ. Quando operado no modo SIM pode-se selecionar um único íon a ser monitorado ou vários íons característicos dos analitos alvo de interesse em Q1, que estão presentes em uma mistura complexa. Neste caso, o q2 e o Q3 servem somente para transmitir os íons filtrados no Q1 (Dallegrave (2012) e Munaretto (2012)). De forma semelhante, a abordagem utilizando-se Q1 e q2 como focalizadores e Q3 para a seleção de certos fragmentos também é viável, já que a seleção, neste caso, ocorrerá mais próximo ao detector.

Por fim, no modo **MRM** é monitorada a fragmentação de um íon precursor selecionado no Q1 e seus correspondentes íons produtos que são filtrados em Q3. A ausência da varredura permite que o equipamento focalize apenas o precursor e o produto, aumentando a sensibilidade para o monitoramento, que é associado a um aumento na seletividade, podendo ser considerada uma análise de caráter específico. Os íons monitorados no primeiro analisador são denominados “íons precursores”. No MRM serão monitorados os denominados “íons produtos”, ou seja, os íons produzidos provenientes da fragmentação dos íons precursores na câmara de colisão, q2, selecionados no primeiro analisador de massas, conforme ilustrado na FIGURA 1. Desta maneira a análise é realizada através do acompanhamento da transição entre os fragmentos do íon precursor e do íon produto, ou seja, m/z precursor > m/z produto. Esse método de aquisição de dados só é possível com o acoplamento em tandem MS/MS (Dallegrave (2012) e Munaretto (2012)).

O modo *full scan* é o mais comum e simples, pois pode ser realizado com apenas um único analisador do tipo quadruplo, por exemplo. Já o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) é o mais complexo e de maior custo, uma vez que é necessário o acoplamento de três quadrupolos para sua avaliação. De acordo com a literatura, ao se comparar os três modos de aquisição (*full scan*, SIM e MRM) na determinação de contaminantes emergentes (hormônios), todos se mostraram lineares e reproduzíveis. No entanto, com o modo de aquisição de dados MRM, tem-se maior sensibilidade e seletividade, enquanto a melhor linearidade foi evidenciada com o modo *full scan* (Dallegrave (2012)).

2.2.2 Acoplamento GC-MS/MS para a Determinação de CE

Nos últimos anos, o avanço da tecnologia analítica possibilitou o acoplamento de métodos de separação com métodos de detecção, desse modo, tornou-se possível acoplar a cromatografia à espectrometria de massas sequencial, ou em *tandem* (MS/MS). Técnicas hífenadas como a GC-MS possuem grandes vantagens em relação aos

procedimentos tradicionais de isolamento e identificação de compostos, os quais são geralmente laboriosos, demorados e requerem grandes quantidades de amostras (Dallegrave (2012) e Petta (2008)).

Ao se analisar os resultados gerados pela hifenização das técnicas GC-MS/MS com o método de aquisição de dados MRM, o cromatograma obtido neste modo de análise é muito mais simples, contendo apenas um pico cromatográfico referente à transição selecionada pelo íon precursor e seu respectivo fragmento, o íon produto. Portanto, esse procedimento torna-se ideal para a análise de compostos alvo em matrizes complexas (Petta (2008)). Dessa maneira, nota-se que a GC-MS/MS possui a vantagem de ser uma técnica extremamente sensível e seletiva para a determinação simultânea de contaminantes emergentes em pequenas quantidades de amostras que contêm concentrações baixas de analitos.

Quando há coeluição de dois (ou mais) analitos, o método de aquisição de dados MRM permite a discriminação total entre duas substâncias diferentes, inclusive se elas possuírem a mesma massa molecular. Esta técnica em seu conjunto é aplicável em amostras complexas e torna possível a quantificação da espécie no nível traço, obtendo-se limite de quantificação na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ – ng L^{-1} (ppb–ppt), geralmente utilizando-se padrão interno para a quantificação (Garcia (2011)).

Contextualizando com os compostos apresentados anteriormente, para os hormônios esteroidais, por exemplo, a GC-MS é comparável a LC-MS na questão de tempo. De acordo Dallegrave (2012), a GC-MS/MS tende a ser mais rápida, apresenta uma maior capacidade de separação, inclusive para epímeros, entretanto é mais laboriosa e geralmente necessita de uma etapa de derivatização. Mesmo assim, essa hifenização de técnicas de separação e detecção impulsionou a análises de contaminantes emergentes presentes no ambiente (Mottaleb *et al* (2009); Munaretto (2012) e Quintana *et al* (2004)). Porém, independentemente da metodologia analítica selecionada, a etapa prévia à injeção das amostras nos sistemas cromatográficos tem sido fundamental para se alcançar baixos limites de quantificação, eliminar interferentes bem como o efeito de matriz.

2.3 DERIVATIZAÇÃO

Em análises químicas, inicialmente, se busca avaliar analitos através do método menos moroso, em que estes estejam em sua estrutura original, porém, muitas vezes, estes analitos não se encontram em uma forma química compatível com a técnica analítica empregada. A derivatização é um processo químico que modifica a estrutura do composto de interesse gerando novos produtos com a finalidade de melhorar o perfil

cromatográfico (Becker (2012) e Lima (2013)). Compostos com baixa volatilidade, elevada polaridade e baixa estabilidade térmica são difíceis de serem analisados por GC, portanto, uma alternativa é a inclusão da etapa de derivatização no procedimento analítico (Lima (2013) e Orata (2012)). Desta forma, as potencialidades da GC frente aos sistemas de LC, como alta resolução e eficiência, podem ser aplicadas.

Substâncias com grupos funcionais tais como carboxila ($-\text{COOH}$), hidroxila ($-\text{OH}$), tiol ($-\text{SH}$), amino ($-\text{NH}_2$) e imino ($=\text{NH}$) são difíceis de serem analisadas por CG, pois não apresentam volatilidade compatível com a técnica, ou seja, temperaturas de ebulição de até aproximadamente 300°C . A análise desses compostos por GC em sua forma original pode acarretar em interações com os grupos silanóis da fase estacionária ou até mesmo com as impurezas do sistema cromatográfico, resultando em uma pior resolução cromatográfica, bem como, menor detecção (Becker (2012)).

A derivatização é a substituição dos hidrogênios livres ativos das funções químicas citadas anteriormente por grupamentos mais apolares que não apresentam a característica de formação de ligações de hidrogênio. Essa substituição resulta na modificação da estrutura química do analito e também de seus fragmentos (Lima (2013) e Sadanala *et al* (2012)), nos casos onde a MS é utilizada como sistema de detecção. Neste caso, com a introdução de alguns grupos funcionais, pode-se aumentar a resposta do detector ou gerar espectros de massas mais simples de serem analisados.

As reações de derivatização, que podem ser realizadas simplesmente por adição do reagente derivatizante à amostra líquida, no próprio injetor do cromatógrafo à gás (*on line*) ou após o processo de extração (derivatização pós-extração) (*offline*), têm o intuito de converter os analitos em suas formas compatíveis com os processos de separação e detecção subsequentes (Basheer *et al* (2005) e Quintana *et al* (2004)). A TABELA 2, a seguir, descreve brevemente procedimentos encontrados na literatura para a determinação de alguns dos analitos de interesse empregando-se a etapa de derivatização.

TABELA 2: Revisão de literatura sobre algumas condições de derivatização.

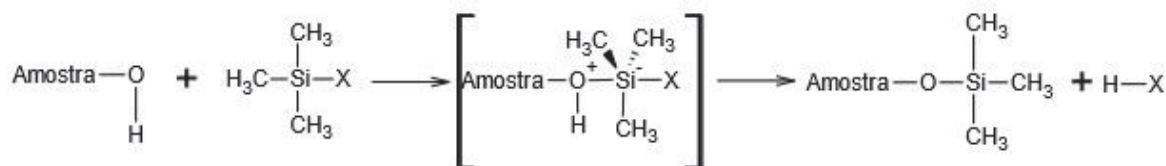
Analito	Matriz	Agente derivatizante	Condições da reação de derivatização	Modo	Técnica analítica	Referência
E1 E2 EE2	Águas superficiais	BSTFA MSTFA MTBSTFA	50-100 µL 10-60 min 60°C	<i>offline</i>	GC-MS	Basheer <i>et al</i> (2005a)
PRO E1 E2 EE2	Águas superficiais	MSTFA MSTFA:TMSI	50 µL 60 min 55°C	<i>offline</i>	GC-MS	Dallegrove (2012)
PTM IBU CAF	Efluentes urbanos	MSTFA:TMSI	10-300 µL 60 min 70°C	<i>offline</i>	GC-MS	Becker (2012)
E1 E2 EE2 E3	Águas superficiais e efluentes urbanos	MTBSTFA BSTFA BSTFA:TMSI	200 µL 100 min 85°C	SPE	GC-MS/MS	Quintana <i>et al</i> (2004)
TRI	Águas superficiais	Anidrido acético	200 mL	<i>offline</i>	GC-MS	Bagheri; Saraji (2003)
TRI	Peixe	MSTFA	150 µL 45 min 60°C	SPE	GC-MS	Mottaleb <i>et al</i> (2009)
4NP 4OP BPA E1 E2 EE2 E3	Esgoto	BSTFA:TCMA	100 µL 30 min 80°C	<i>offline</i>	GC-MS	Lima (2013)

Sendo SPE – microextração em fase sólida; GC-MS – Cromatografia gasosa hifenada à espectrometria de massas; GC-MS/MS – Cromatografia à gás hifenada a espectrometria de massas em tandem; MSTFA – N-metil-N(trimetil-silil) trifluoroacetamida; BSTFA – N,O-bis(trimetil-silil)trifluoroacetamida; TMSI – 1-(trimetil-silano)imidazol; MTBSTFA – N-ter(butil-dimetil-silil)-N-metiltrifluoroacetamida; E1 – estrona; E2 – β -estradiol; EE2 – 17- α -etinilestradiol; E3 – estriol; PRO – progesterona; IBU – ibuprofeno; PTM – paracetamol; CAF – cafeína; BPA – bisfenol A; 4OP – 4-octilfenol; 4NP – 4-nonilfenol; TRI – triclosan.

As reações de derivatização utilizadas para GC dividem-se em três tipos gerais: a alquilação, a acilação e a sililação, que serão apresentadas a seguir. Através destes processos químicos, compostos altamente polares, tais como ácidos orgânicos, amidas, compostos poli-hidroxi e aminoácidos são tornados adequados para análise (Orata (2012)).

• **Reações de Sililação:** É o método mais comumente utilizado na derivatização de compostos orgânicos que possuem hidrogênio ativo. Essas reações caracterizam-se por serem simples, rápidas, reprodutíveis, de única etapa e por apresentarem alto rendimento sob condições brandas (Basheer *et al* (2005a)). Ao realizar uma sililação, bloqueia-se sítios próticos, havendo uma redução de interações do tipo dipolo-dipolo, elevando a volatilidade dos compostos, resultando em picos estreitos e simétricos. Como pode-se observar na FIGURA 2, a reação ocorre através de um ataque nucleofílico do tipo SN2 (substituição nucleofílica bimolecular) (Becker (2012); Dallegrave (2012); Lima (2013) e Orata (2012)). Nos hormônios estrógenos, a derivatização corresponde à substituição do hidrogênio ativo de um grupo polar (-OH) por um grupamento a base de organosilano (trimetilsilil). Os derivatizantes mais utilizados para E1, E2, E3 e EE2 são o N,O-bis(trimetil-silil)trifluoroacetamida (BSTFA) e o N-metil-N(trimetil-silil) trifluoroacetamida (MSTFA) (Basheer *et al* (2005) e Orata (2012)).

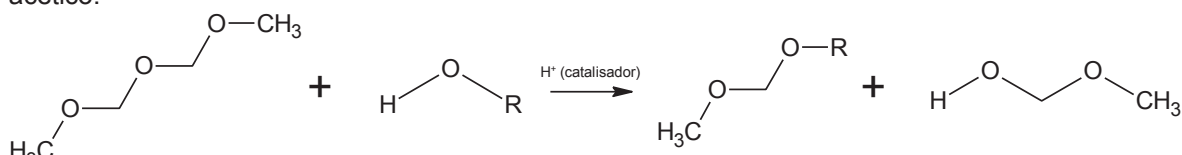
FIGURA 2: Mecanismo geral da reação de sililação, onde X varia de acordo com o tipo de derivatizante utilizado.



FONTE: Dallegrave, 2012.

• **Reações de Acilação:** É um tipo de reação na qual um grupo acila é introduzido a um composto orgânico. Geralmente, ocorre a entrada do grupo acilo e a saída do grupo hidroxila. Os compostos que contêm hidrogênios ativos (-OH, -SH e -NH) podem ser convertidos em ésteres, tioésteres, e amidas, respectivamente, por meio de acilação. A acilação é conhecida por produzir compostos de alta volatilidade. Também melhora a estabilidade desses compostos que são termicamente lábeis através da inserção de grupos de proteção na molécula (Orata (2012)). A FIGURA 3 ilustra um exemplo de uma reação de acilação entre o anidrido acético e um álcool. Os reagentes acilantes oferecem a vantagem de introduzir grupos de captura de elétrons e, por consequência, melhorar a detecção durante a análise. Estes reagentes estão disponíveis como anidridos de ácidos, derivados de acilo ou haletos de acila ((Orata (2012) e Sadanala *et al* (2012)).

FIGURA 3: A reação entre o anidrido acético e um álcool para produzir éster de etila e ácido acético.



FONTE: Modificado de Orata, 2012.

• **Reação de Alquilação:** É reação da entrada de um grupo alquila no lugar do hidrogênio da amina, diminuindo desta maneira a polaridade da molécula. A alquilação de uma amina primária gera uma amina secundária, e de uma amina secundária, por consequência, gera uma amina terciária. O grupo de reagentes de alquilação mais usados são os aldeídos/borohidreto de sódio. Um exemplo dessa reação de derivatização é a análise de anfetaminas em que é empregada a derivatização com propanal/borohidreto de sódio para formar N-propil derivados (Carvalho (2011)).

Como observado na TABELA 2, a sililação tem sido a metodologia mais utilizada para a derivatização de contaminantes orgânicos, e de interesse deste trabalho, sendo os agentes derivatizantes mais comuns o BSTFA e o MSTFA. As condições de tempo e temperatura geralmente utilizadas variam de 15 a 60 min e de 40°C a 80°C, respectivamente. Vale ressaltar que, apesar da adição de mais uma etapa no processo analítico, estes trabalhos reforçam o significativo ganho de detectabilidade dos analitos derivatizados quando comparado às análises dos compostos que não passaram pela etapa de derivatização, o que corrobora para menores limites de quantificação do método a ser proposto.

2.4 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

O constante progresso nos diferentes campos das ciências tem exigido uma evolução dos métodos analíticos para que estes possam suprir a demanda por novos conhecimentos nessa área. Buscando técnicas de extração mais seletivas, rápidas, de baixo custo e eficientes para análises em matrizes complexas, o desenvolvimento constante de novas fases, equipamentos, acessórios e métodos automatizados que atendam as diversas necessidades das análises ambientais tem sido requerido. As técnicas de extração convencionais, como extração líquido-líquido (do inglês, *liquid-liquid extraction* – LLE) e extração em fase sólida (do inglês, *solid-phase extraction* – SPE), utilizados no tratamento de amostras ambientais para determinações de contaminantes diversos por técnicas cromatográficas são caracterizadas por apresentarem altas taxas

de recuperação e, em especial na LLE, pela sua simplicidade. Porém, algumas ressalvas devem ser destacadas para ambas as técnicas.

A LLE apresenta como desvantagens o consumo excessivo de solventes orgânicos de alta pureza, a exposição do analista a compostos tóxicos, a necessidade de concentração da fase orgânica e possível formação de emulsão entre as fases, o que resulta na diminuição de precisão entre ensaios (Lima (2013)). Já a SPE apesar de possuir um número grande de fases extratoras disponíveis no mercado, apresenta algumas limitações como o alto custo de fases seletivas (por exemplo *Oasis*[®] e *HLB*[®]), o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes endógenos da matriz, a utilização de uma grande quantidade de solventes orgânicos para a eluição, o fato de existir variações analíticas entre cartuchos extratores de mesmo fabricante, a existência de várias etapas operacionais para sua execução e o fato de não permitir a extração de compostos voláteis (Arthur; Pawliszyn (1990)).

Nos últimos anos, as recentes técnicas miniaturizadas de preparo de amostras têm ganhado destaque frente aos métodos convencionais. A microextração em fase sólida (SPME, do inglês, *solid-phase microextraction*), introduzida por Arthur e Pawliszyn (1990), é um exemplo típico de técnica miniaturizada de preparo de amostras. Esta técnica quando hifenada a sistemas analíticos propicia resultados de análises rápidas, baixo consumo de solvente (em alguns casos nenhum consumo), menor exposição dos analistas às amostras possivelmente contaminadas e aos solventes tóxicos, assim como, maior precisão analítica.

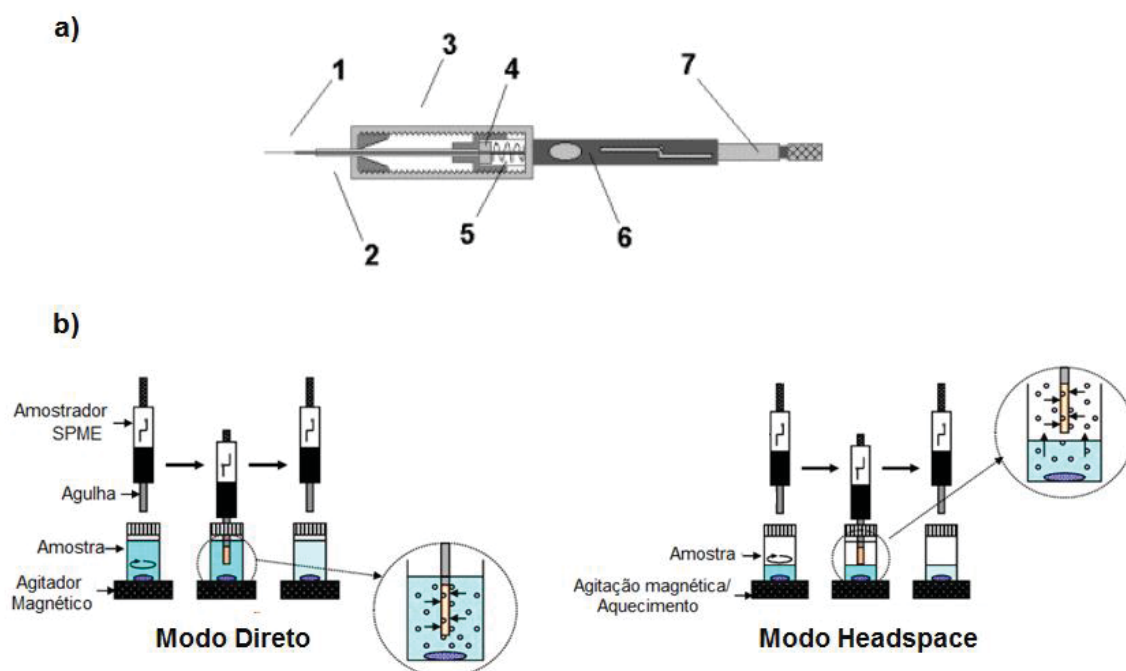
Na técnica SPME, em especial em seu formato disponibilizado comercialmente, utiliza-se um dispositivo semelhante a uma seringa contendo uma fibra de sílica fundida recoberta com uma fase extratora polimérica ou um sólido adsorvente, onde os solutos são diretamente extraídos da amostra para o recobrimento da fibra (FIGURA 4a). A técnica consiste de um processo baseado no equilíbrio de partição entre as fases: aquosa (amostra homogênea), polimérica extratora (fibra) e gasosa. Durante a extração em um sistema trifásico considerado ideal, os analitos migram entre as três fases até que o equilíbrio de partição seja atingido (FIGURA 4b esquerda). Dessa forma, a massa extraída do analito pela fibra está relacionada ao equilíbrio de massas nas fases do sistema. A extração pode ser realizada pela exposição da fibra diretamente na amostra, ou na fase gasosa (do inglês, *headspace*) (FIGURA 4b direita). A quantidade de analito absorvido (migrando para o interior da fibra) ou adsorvido (permanecendo na camada superficial da fibra) está linearmente relacionada com a concentração inicial do analito na amostra, permitindo assim, a análise quantitativa (Musteata; Pawliszyn (2005)).

Os revestimentos disponíveis comercialmente para SPME mais utilizados têm sido os filmes de PDMS (polidimetilsiloxano), que é um revestimento líquido de alta

viscosidade e estabilidade. Já o poliacrilato (PA) é um sólido que pode liquefazer-se em altas temperaturas. Tanto o PDMS, quanto o PA, extraem analitos baseados no processo de absorção. Os demais revestimentos: PDMS-DVB (polidimetilsiloxano-divinilbenzeno), CW-DVB (carbowax-divinilbenzeno), CW-TR (carbowax-resina TPR-100 suportada), CX (carboxen), entre outros, são revestimentos mistos, onde a fase mais superficial é um sólido poroso. Nestes revestimentos predomina-se o processo de adsorção.

Por algum tempo o principal alvo das pesquisas em termos de técnicas miniaturizadas de preparo de amostras foi a busca de automação das análises, via extração em tubo capilar (do inglês, *in-tube* SPME) (Silva *et al* (2008)) ou por meio de acoplamentos em linha com os sistemas cromatográficos (GC, LC e CE). Acreditando em um suficiente desenvolvimento nesta vertente, atualmente, a maioria dos estudos com relação ao progresso das técnicas de microextração está focada na avaliação de novas tecnologias para o desenvolvimento de fases extratoras.

FIGURA 4: a) Dispositivo comercial para SPME: 1 – Fibra extratora, 2 – Agulha de aço, 3 – Corpo do aplicador, 4 – Septo de silicone, 5 – Guia do aplicador, 6 – Guia do êmbolo, 7 – Êmbolo; b) Representação dos modos de extração SPME: direto (à esquerda) e *headspace* (à direita).



FONTE: Adaptado de Lord; Pawliszyn (2000).

Como apresentado anteriormente, algumas fases extratoras estão disponíveis no comércio para as análises por SPME. Porém, o desenvolvimento de novas fases extratoras mais seletivas, estáveis e de baixo custo, tem sido necessário para o desenvolvimento destas técnicas, buscando uma maior gama de aplicações e métodos com sensibilidade analítica adequada para as determinações de contaminantes diversos em amostras complexas. Neste contexto, novos revestimentos, tais como: polímeros

condutores (Chaves *et al* (2009)), materiais de acesso restrito (RAM) (Musteata; Pawliszyn (2005)), nanomateriais (Liu *et al* (2012)), polímeros molecularmente impressos (MIP) (Musteata *et al* (2007)), materiais imunossorventes (Liu *et al* (2004)), fibras resfriadas (Menezes; Cardeal (2013)), entre outros, têm sido avaliados.

Outros materiais, ainda pouco avaliados como fases extratoras, apresentam em suas propriedades físico-químicas potencial aplicabilidade para tal. Dentre essa classe, pode-se destacar os polímeros, naturais ou sintéticos, que incham em água e são comumente conhecidos como hidrogéis (Basheer *et al* (2008)).

2.5 HIDROGÉIS

Hidrogéis, estruturalmente, consistem em redes poliméricas tridimensionais. São compostos por um esqueleto feito de polímero, água e um agente reticulador (Mendonça *et al* (2013)). A preparação dos hidrogéis envolve a formação de ligações cruzadas de polímeros lineares ou polimerização simultânea de monômeros monofuncionais ou ainda formação de ligações cruzadas com monômeros polifuncionais (Sadahira (2007)).

Os hidrogéis são capazes de absorver e reter volumes de água e fluidos corpóreos sem se dissolverem. Para isso, em sua estrutura existem grupos hidrofílicos que são hidratados, além de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. As ligações cruzadas, também conhecidas de reticulações, são tipicamente de natureza covalente ou iônica. Todavia, as ligações de hidrogênio, as forças de Van der Waals e as interações hidrofóbicas também podem formar reticulações gerando redes intumescidas que possuem comportamento de hidrogéis (Bonacin (2011)).

A difusão da água dentro da partícula faz com que o hidrogel aumente de volume devido ao afastamento das cadeias poliméricas. O deslocamento da cadeia é sempre no sentido oposto ao do movimento da água e como consequência, a água fica armazenada dentro dos poros formados por esse deslocamento das moléculas do hidrogel (Kabiri e Zohuriaan-Mehr (2003) e Peppas *et al* (2000)).

Tais materiais, pela sua característica de intumescimento, sofrem uma substancial expansão ou recolhem-se em resposta à presença e ausência de água, respectivamente. Atualmente, têm sido bastante empregados principalmente para aplicações biomédicas e farmacêuticas, como na produção de curativos, lentes de contato, órgãos superficiais (implantes) e sistemas de liberação controlada de fármacos (Chaterji *et al* (2007) e Hoffman (2012)).

Os hidrogéis também têm sido desenvolvidos como materiais de estímulos sensíveis, que podem sofrer alterações de volume em respostas às abruptas pequenas

mudanças nos parâmetros do meio que as contém, como temperatura, pH e força iônica, por exemplo (Almeida (2010)).

Estas características, associadas à sua composição química abrem caminhos para o estudo destes materiais em experiências de separação de fases, ou mais precisamente, da sua utilização como fase extratora para compostos orgânicos polares e menos polares simultaneamente, já que em suas estruturas geralmente existem cadeias poliméricas com grupamentos –OH residuais. No contexto do trabalho, o hidrogel modificado faz parte de um sistema SPME e é responsável pela sorção de substâncias presentes na água para posterior análise por técnica cromatográfica.

Porém, poucos trabalhos na literatura avaliaram materiais baseados em hidrogéis para extração de compostos orgânicos em matrizes complexas. Bahram *et al* (2011) descreveram o uso do hidrogel de poli(estireno-co-anidrido maleico), um polímero sensível a mudanças de pH, para extração e pré-concentração do corante verde malaquita em amostras aquosas e quantificação por espectrofotometria UV-Vis, alcançando limites de detecção de $4,1 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e coeficientes de variação de apenas 3,03%.

Em outro estudo, Basheer *et al* (2005b) avaliaram o desenvolvimento de uma fibra oca com hidrogel de polimetilmetacrilato depositado nos poros dessa mesma fibra. As determinações de estrogênios sintéticos, em águas potáveis e de reservatórios, por GC-MS, forneceram limites de detecção entre 0,03 e 0,8 ng L⁻¹.

Outro resultado que estimula maiores estudos sobre estes materiais, baratos e de sínteses simples, como fase extratora para técnicas de preparo de amostras foi obtido por Chen *et al* (2012). Neste estudo, desenvolvendo dispositivos de amostragem passiva como sistema de detecção de micropoluentes em matrizes ambientais aquosas, os autores, avaliando os hidrogéis de agarose e de poli(acrilamida), observaram que o uso de hidrogel de poli(acrilamida) como fase difusiva age, na verdade, como fase extratora, adsorvendo significamente o analito sulfametazol. Dessa maneira, observando suas diversas aplicações se faz necessário um estudo mais aprofundado sobre hidrogéis para melhor compreender sua síntese, seu funcionamento estrutural, bem como sua potencialidade como fase extratora.

2.5.1 Estrutura dos Hidrogéis

Os parâmetros mais importantes utilizados para caracterizar a estrutura da rede dos hidrogéis são a fração volumétrica no inchamento (v_2), a massa molar média entre ligações cruzadas (M_c) e o tamanho do poro da rede (ξ) (Peppas *et al* (2000) e Sadahira (2007)). Trata-se a fração volumétrica do polímero no estado de inchamento como uma

medida da quantidade de líquido absorvido e retido pelo hidrogel. A massa molar entre duas ligações cruzadas consecutivas, que podem ser de natureza química ou física, é uma medida do grau de ligações cruzadas do polímero. A correlação da distância entre duas ligações cruzadas, ξ , fornece uma medida do espaço disponível entre cadeias macromoleculares (Peppas *et al* (2000)).

O tamanho dos poros dos hidrogéis podem ser classificados como macroporoso (entre 50 nm e 1000 nm), microporoso (entre 5 nm e 50 nm) e não poroso (só existem a nível molecular) (Sadahira (2007)). A distinção entre estes tipos de géis não é sempre clara, porque os poros raramente apresentam-se bem definidos, especialmente para géis não porosos.

Com estas informações pode-se, por exemplo, fazer um estudo mais detalhado se um determinado hidrogel tem a capacidade de comportar dentro de seus poros uma determinada substância de tamanho conhecido, como um medicamento para casos em que se emprega hidrogéis voltados para distribuição controlada de fármacos.

2.5.2 Propriedades Físico-químicas dos Hidrogéis

A razão de ligações cruzadas acontecerem em um material é uma das propriedades físico-químicas mais importantes com relação ao intumescimento (ou inchamento) dos hidrogéis. É definido como a razão de mol do agente de reticulação para o número de mol das unidades de repetição do polímero (Peppas *et al* (2000)). Dessa forma, quanto maior a razão de ligações cruzadas, maior a quantidade de agente de reticulação é incorporada na estrutura do hidrogel, levando a formação de um hidrogel com uma estrutura mais rígida. Conseqüentemente, o intumescimento será menor quando comparado com o mesmo hidrogel que apresenta menor razão de ligações cruzadas (Almeida (2010)).

Outro fator que modifica o inchamento do hidrogel é a estrutura química dos polímeros. De acordo com a literatura, aqueles contendo grupos hidrofílicos incham em maior grau quando comparado com aqueles contendo grupos hidrofóbicos, devido ao colapso destes na presença da água (Sadahira (2007)).

A questão do intumescimento está ligada diretamente com as propriedades mecânicas dos hidrogéis. Mudanças no grau de ligações cruzadas têm sido utilizadas para alcançar propriedades mecânicas almejáveis. Aumentando o grau de ligações cruzadas o hidrogel torna-se mais resistente (Mendonça *et al* (2013)). Entretanto, maior grau de ligações cruzadas resulta em uma estrutura frágil. Portanto, há um número ótimo de ligações cruzadas para a obtenção de hidrogel resistente e elástico. Em um sistema de liberação controlada de fármacos, por exemplo, o hidrogel deve manter sua

integridade até chegar na região onde deverá liberar o agente terapêutico. Estas características podem e devem ser consideradas também no caso da avaliação desses materiais como fase extratora, pois o hidrogel estará em contato direto tanto com a matriz aquosa de interesse quanto com pequenas quantidades de solventes orgânicos requeridos para a etapa de dessorção dos analitos da rede polimérica.

2.5.3 Classificação dos Hidrogéis

Os hidrogéis podem ser classificados como neutros ou iônicos, baseados na natureza dos grupos laterais de suas cadeias poliméricas. Desta maneira, eles podem ser constituídos de redes homopoliméricas ou copoliméricas, tendo em vista o método de preparação (Sadahira (2007)). Outro modo de classificá-los é baseando-se na estrutura física como rede amorfa, semicristalina, ligação de hidrogênio, supermolecular e agregados hidrocoloidais (Peppas *et al* (2000)).

Ainda pode classificar os hidrogéis de acordo com o método de formação e de manutenção da sua estrutura polimérica. Deste modo, têm-se os géis reversíveis ou físicos, formados por estruturas que se mantêm como resultado de interações a nível intra ou intermolecular, como ligações iônicas, ligações de hidrogênio entre outras. E têm-se os hidrogéis permanentes ou químicos, que são aqueles formados por estruturas resultantes de ligações covalentes. Estes podem ser formados através de reticulação de polímeros solúveis em água com outros materiais ou da conversão de polímeros hidrofóbicos em hidrofílicos através de reações de reticulação para formar uma rede polimérica (Kabiri e Zohuriaan-Mehr (2003)).

As ligações covalentes estão presentes nos hidrogéis formados pelo método químico, e estão entre as cadeias de polímero do hidrogel quimicamente reticulado. Já nos hidrogéis sintetizados fisicamente, são considerados como possuidores das interações do tipo ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas.

O maior interesse pelos hidrogéis fisicamente reticulados, atualmente, é a redução do custo do processo de síntese, pois este não utiliza agente reticulante adicional. Com os hidrogéis formados por métodos químicos, em sua maioria, têm-se o interesse voltado para a boa resistência mecânica (Akhtar *et al* (2015)). Destaca-se, independentemente do processo de síntese de um determinado hidrogel, as diferentes características com relação à polaridade deste material, o que corrobora para uma vasta possibilidade de interações entre a fase extratora e os analitos. Dessa maneira, o desenvolvimento de novas fases extratoras baseadas em hidrogéis torna-se um campo promissor para o

emprego destes em técnicas miniaturizadas de preparo de amostras, especialmente no que se refere à extração simultânea de multirresíduos de características anfifílicas.

2.5.4 Síntese dos Hidrogéis

Existem dois tipos de métodos capazes de formar hidrogéis, os métodos físicos e os químicos, como já citado anteriormente. As ligações covalentes estão presentes nos hidrogéis formados pelo método químico, e estão entre as cadeias de polímero do hidrogel quimicamente reticulado. Já nos hidrogéis sintetizados fisicamente, são considerando as interações do tipo ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas para evitar a dissolução em meio aquoso.

O maior interesse pelos hidrogéis fisicamente reticulados, atualmente, é a redução do custo do processo de síntese, pois este não utiliza agente de reticulação adicional (Akhtar *et al* (2015)). A TABELA 3 apresenta alguns exemplos de hidrogéis fisicamente reticulados com três métodos físicos distintos.

TABELA 3: Alguns exemplos de hidrogéis reticulados fisicamente.

Polímero	Método de síntese	Referência
Polietileno glicol e Polibutileno tereftalato	Fusão/policondensação de Polietileno glicol ou Polibutileno tereftalato	Bezemer <i>et al</i> , 2000
Pululano	Nanopartículas de hidrogel	Akiyoshi <i>et al</i> , 1996
Poliacrilamida	Interação antígeno/anticorpo	Miyata <i>et al</i> , 1999

FONTE: Modificado de Akhtar *et al* (2015).

Por outro lado, com os hidrogéis formados por métodos químicos têm-se o interesse voltado para a boa resistência mecânica (Akhtar *et al* (2015)). A TABELA 4 exemplifica alguns dos hidrogéis reticulados quimicamente com diferentes métodos para síntese.

TABELA 4: Alguns exemplos de hidrogéis reticulados Quimicamente.

Polímero	Método de síntese	Referência
Quitosana-Polivinil álcool	Reticulação com aldeído	Zu <i>et al</i> , 2012
Gelatina	Reticulação com aldeído	Yamamoto <i>et al</i> , 2000
Albumina	Reticulação com aldeído	Willmott <i>et al</i> , 1984
Quitosana	Reticulação com aldeído	Jameela e Jayakrishnan, 1995
Dextrano	Reação de adição	Brondsted <i>et al</i> , 1995
Polivinil álcool	Reação de condensação	Ray <i>et al</i> , 2010
Gelatina	Reação de condensação	Kujipers <i>et al</i> , 2000

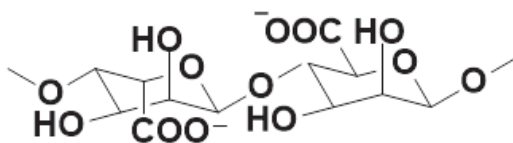
FONTE: Modificado de Akhtar *et al* (2015).

Como pode-se observar, muitos métodos de síntese de hidrogéis têm sido desenvolvidos recentemente. Com uma gama tão grande de hidrogéis pode-se ter diferentes polaridades e, assim, diferentes interações com analitos. Além dos polímeros apresentados nas TABELA 3 e TABELA 4, outros materiais podem ser incorporados à

rede polimérica do hidrogel, dependendo das características buscadas para este material para fins de extração. Duas possibilidades, de baixo custo e fácil preparo, é o uso de alginato como material base e zeína como modificador, que a princípio podem inserir um caráter anfifílico à fase extratora, buscando-se assim estabilidade física e alta eficiência de extração para diferentes classes de compostos orgânicos.

Os alginatos, materiais naturais provenientes da parede celular de algas marinhas, são potenciais candidatos para serem utilizados na formação de hidrogéis, uma vez que são biomoléculas que podem formar géis facilmente por procedimentos simples. São heteroglicanos, compostos de cadeias lineares de ácido α -L-gulurônico e ácidos β -D-manurônicos em proporções variáveis de blocos de construção originando polieletrólitos aniônicos altamente carregados (Painter (1983)). O alginato de sódio é a forma mais comum comercialmente e pode ser reticulado através de íons de cálcio (Akhtar *et al* (2015)), também conhecida como reticulação instantânea. Na indústria, os géis de alginato podem ser utilizados como matrizes para liberação de proteínas e para o encapsulamento de células vivas (Chaterji *et al* (2007)). A FIGURA 5 demonstra a fórmula estrutural química de um íon de alginato.

FIGURA 5: Proposta da fórmula estrutural química do íon alginato.



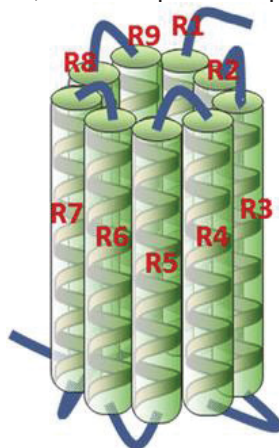
FONTE: Akhtar, L. *et al* (2015).

Uma série de artigos relataram o desempenho de esferas de hidrogel à base de alginato como fase de extração quando associadas a outros materiais. O alginato de sódio já foi combinado com nanotubos de halloysite (Cavallaro *et al* (2013)) e também com multicamadas de nanopartículas/nanotubos de magnetita (Bunkoed; Kanatharana (2015)) e testados como sorvente de hidrocarbonetos violeta de cristal e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, respectivamente. O hidrogel à base de algas, alginato, foi capaz de extrair os íons metálicos Cu (II) e Pb (II) em amostras de água (Wang *et al* (2016)). O combinado de alginato de cálcio encapsulado com óxido de grafeno (GO) foi utilizado para extrair Cu (II) (Algothmi *et al* (2013)), azul de metileno (Li *et al*. (2013)) e ciprofloxacina (Wu *et al*. (2013)). As capacidades máximas de adsorção foram 60,2 mg g⁻¹, 181,81 mg g⁻¹ e 39,09 mg g⁻¹, respectivamente.

Já a zeína é a maior proteína do milho, em questão de volume, e é um biopolímero relativamente conhecido. Devido à sua propriedade de formação de filmes, foi investigado seu potencial uso como material estrutural para filmes e dispersões (Cho

et al (2010), Han *et al* (2014) e Xu *et al* (2011)). Pertence a uma classe de proteínas, a prolamina, e possui frações polipeptídicas diferentes, que podem ser divididas em quatro classes principais (α , β , γ -, δ -zeína). A α -zeína, representada estruturalmente pela FIGURA 6, apresenta características hidrofóbicas fortes permitindo, por exemplo, a preparação de nanopartículas com excelentes propriedades para o encapsulamento de muitos compostos hidrofóbicos (Zhong; Jin (2009)). As películas de zeína são geralmente preparadas por dissolução em álcoois alifáticos seguidos pela evaporação do solvente. Esses filmes são rígidos e quebradiços, e geralmente requerem a adição de plastificantes (Erickson *et al.* (2014)).

FIGURA 6: Esquema exemplificando a funcionalidade da α -zeína. Em que de R1 a R9 pode-se ter outra molécula ligada, de zeína por exemplo.



FONTE: Young Z. *et al* (2015).

Com a combinação adequada de moléculas polares e menos polares, os hidrogéis podem exibir um caráter anfifílico. Neste sentido, a combinação de alginato e zeína é escassamente explorada na literatura. Alcântara *et al* (2010) prepararam grânulos feitos de alginato, zeína e hidróxidos duplos em camadas (LDH) com o objetivo de usar como sistemas de administração de fármacos, enquanto Laelorspoen *et al* (2014) empregaram alginato e zeína modificada com ácido cítrico para microencapsular uma bactéria probiótica, a saber, *Lactobacillus acidophilus*. Mais recentemente, foram estudados sistemas de administração oral de fármacos baseados em alginato-zeína com superóxido dismutase encapsulada (SOD). SOD foi protegido das condições severas do trato gastrointestinal e liberado no intestino delgado (Lee *et al* (2016)). De acordo com a literatura, não há trabalho prévio que explore a combinação de alginato e zeína como fase de sorção. Portanto, as características dos hidrogéis são muito promissoras quanto à sua utilização como materiais para experiências de separação de fases ou, mais

precisamente, como fases de extração para a retenção simultânea de compostos orgânicos de caráter anfifílico.

Este trabalho apresenta pela primeira vez a preparação de um hidrogel produzido de alginato de sódio e zeína, suportado em uma fibra de polipropileno (fibra PP), por um método simples, rápido e de baixo custo. O conjunto de fibra de polipropileno-hidrogel (PP-hidrogel) foi utilizado como dispositivo SPME para extração em meio aquoso de compostos de média e alta polaridade, o que tem sido um grande obstáculo das fases extratoras clássicas e/ou comerciais. A técnica GC-MS/MS foi empregada como ferramenta analítica para demonstrar que o dispositivo é capaz de extrair com sucesso compostos polares como hormônios, agentes anti-inflamatórios, antissépticos, analgésicos, entre outros. As propriedades físico-químicas do hidrogel foram totalmente investigadas e associadas ao desempenho do hidrogel como fase de sorção, além de ser feita análise de alguns parâmetros de mérito e aplicação em amostras de águas superficiais da região metropolitana de Curitiba-PR.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação de uma nova fase extratora baseada em hidrogel de alginato e zeína para microextração em fase sólida e determinação cromatográfica (SPME-GC-MS/MS) de microcontaminantes orgânicos diversos em amostras aquosas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método cromatográfico (GC-MS/MS) para análise de contaminantes emergentes;
- Sintetizar e avaliar materiais baseados em hidrogéis para extração de microcontaminantes;
- Desenvolver dispositivos SPME com fase hidrogel suportada;
- Padronizar a etapa de extração em matriz aquosa e dessorção – otimizar os parâmetros SPME;
- Analisar alguns parâmetros de mérito do método (SPME-GC-MS/MS);
- Aplicar o método em amostras aquosas ambientais para verificar o potencial de uso do dispositivo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os padrões analíticos (> 99% de pureza) utilizados neste trabalho foram: ibuprofeno (IBU), 4-nonilfenol (4NP), estrona (E1), 17- α -etinilestradiol (EE2), estriol (E3), progesterona (PRO) e testosterona (TES) (*Fluka*[®]); paracetamol (PTM), cafeína (CAF), β -estradiol (E2) e triclosan (TRI) (*Sigma Aldrich*[®]); 4-octilfenol (4OP), bisfenol A (BPA) e bisfenol A deuterado (BPA-d16) (*Supelco*[®]) e atrazina (ATZ) (*Chem Service*[®]).

Utilizou-se água para o preparo de algumas determinadas soluções, nesses casos, a água foi previamente purificada em um sistema Milli-Q, modelo *Advantage A10*, a 18,2 M Ω cm (*Millipore*[®]). Foram utilizados: metanol e hexano (*J.T. Baker*[®]), acetona e etanol (*Panreac*[®]) e acetato de etila (*Mallinckrodt Chemicals*[®]), todos de grau HPLC, para a preparação dos materiais à base de hidrogel e análises cromatográficas. Outros reagentes: azul de metileno, cloreto de sódio, ácido clorídrico e hidróxido de sódio foram adquiridos da empresa *Sigma-Aldrich*[®].

Os reagentes utilizados para a etapa de derivatização foram: anidrido acético, N,O-bis(trimetil-silil)trifluoroacetamida com 1% de trimetil-cloro-silano (BSTFA) em sua formulação, N-metil-N(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) (*Fluka*[®]) e 1-(trimetil silano)imidazole (TMSI) (*Sigma-Aldrich*[®]) utilizado como catalisador, além de carbonato de potássio (*Sigma-Aldrich*[®]).

Nos experimentos foram utilizadas fibras ocas de polipropileno (fibras PP) que possuíam diâmetro interno de 600 μ m, espessura de parede de 200 μ m e tamanho de poro de 0,2 μ m, adquiridas do fornecedor *Membrana*[®] (Alemanha) com o objetivo de serem utilizadas como suporte para o hidrogel com o intuito de se criar um dispositivo *labmade* SPME.

Os reagentes testados para a formação dos hidrogéis foram os seguintes: agarose (AGA), poliacrilamida (PA), álcool polivinílico (PVA), polietileno glicol de massa molar 300 e 4000 g mol⁻¹ (PEG 300 e PEG 4000), alginato de sódio (ALG) e zeína (Z) (*Sigma-Aldrich*[®]). Utilizou-se pectina cítrica e cloreto de cálcio anidro (*Sigma-Aldrich*[®]) como agentes reticulantes quando necessário.

As soluções padrão individuais de cada analito foram preparadas pesando-se aproximadamente 10,00 mg de cada analito e avolumando-se com metanol de forma a originar soluções padrão de concentração 1,0 g L⁻¹. Para as pesagens utilizou-se uma balança analítica digital *Mettler Toledo*[®], modelo *XS205DU*, com precisão de 0,01 mg. A partir destas soluções padrão, soluções trabalho de 250,0 mg L⁻¹ e solução padrão mista de trabalho (mix) de 50,0, 25,0, 10,0 e 1,0 mg L⁻¹ foram preparadas por diluição com o

mesmo solvente. As soluções foram estocadas em tubos de ensaio com tampa e *parafilm* a -20°C.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Limpeza de Vidrarias

Todas as vidrarias foram lavadas exaustivamente com água corrente e, posteriormente, enxaguadas 10 vezes com água destilada e 10 vezes com água ultrapura, esta última sendo importante por ser livre de coloides iônicos ou dissolvidos e de contaminantes orgânicos, sendo assim, apropriada para técnicas analíticas mais sensíveis. Por fim, enxaguou-se com solvente acetona. As vidrarias volumétricas secavam naturalmente em uma bancada limpa, já as vidrarias não volumétricas iam para a estufa à 400°C por cerca de 4 h.

4.2.2 Preparo dos Hidrogéis

Para cada um dos hidrogéis investigados foi utilizada uma metodologia diferente de síntese, como descrito a seguir:

- Agarose (AGA): Preparou-se uma quantidade de 50,0 mL de solução aquosa 1,0% (m/v). Em uma chapa de aquecimento, sob temperatura de 80°C, e agitação. Misturou-se até visual homogeneização. Em seguida, sessou-se o aquecimento e ao atingir-se a temperatura ambiente a reticulação estava finalizada (Newton *et al* (2006) e Petta (2008)).
- Poliacrilamida (PA): Preparou-se uma quantidade de 50,0 mL de solução aquosa 5,0% (m/v). Em uma chapa de aquecimento, sob temperatura de 50°C, e agitação. Misturou-se até visual homogeneização (Almeida (2010) e Mendonça *et al* (2013)).
- Polietileno glicol 300 g mol⁻¹ (PEG 300): Preparou-se uma quantidade de 50,0 mL de solução aquosa 5,0% (v/v). Em uma chapa de aquecimento, sob temperatura de 50°C, e agitação. Misturou-se até visual homogeneização (Farmacopéia do Brasil (2010) e Hoffman (2012)).
- Polietileno glicol 4000 g mol⁻¹ (PEG 4000): Preparou-se uma quantidade de 50,0 mL de solução aquosa 5,0% (v/v). Em uma chapa de aquecimento, sob temperatura de 50°C, e agitação. Misturou-se até visual homogeneização (Farmacopéia do Brasil (2010) e Hoffman (2012)).
- Alginato (ALG): Preparou-se uma quantidade de 10,0 mL de solução aquosa 1,0% (m/v). Em uma chapa de aquecimento, sob temperatura de 60°C, e agitação. Misturou-se

até visual homogeneização. Para a etapa de reticulação instantânea utilizou-se uma solução de cloreto de cálcio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (Akhtar *et al* (2015)).

- Álcool polivinílico (PVA): Preparou-se quantidades de 10,0 mL de soluções aquosas de 5,0% e 10,0% (m/v). Ambas as concentrações foram averiguadas. Em uma chapa de aquecimento, sob temperatura de 65°C , sob agitação. Misturou-se até visual homogeneização. Adicionou-se o agente reticulante, ácido cítrico anidro, a uma proporção de 10,0% (m/m) e novamente homogeneizou-se (Akhtar *et al* (2015)). Por fim, para finalizar o processo de reticulação foi necessário transferir aproximadamente 1,0 mL da solução para dentro de um béquer de 10 mL de volume e levar esse pequeno béquer para a estufa à 40°C , por no mínimo 6,0 h.

A primeira etapa após a síntese destes materiais consistiu na avaliação da estabilidade física e mecânica (robustez ao manuseio e homogeneidade visual) dos hidrogéis, com o objetivo de serem materiais com a possibilidade de estarem suportados no dispositivo *labmade* SPME.

4.2.3 Preparo dos Dispositivos de *Labmade* SPME contendo Hidrogel

Foram avaliadas fibras PP e fibras PP-hidrogel, ou seja, fibras de polipropileno na ausência e presença do hidrogel suportado, respectivamente. Os materiais avaliados foram constituídos de uma blenda de alginato e zeína ou somente alginato. As proporções estudadas foram de alginato 1,0% (m/v), alginato 2,0% (m/v), alginato(1,0%):zeína 99:1 (v/v), alginato(2,0%):zeína 99:1 (v/v), alginato(1,0%):zeína 97:3 (v/v), alginato(2,0%):zeína 97:3 (v/v), alginato(1,0%):zeína 95:5 (v/v) e alginato(2,0%):zeína 95:5 (v/v).

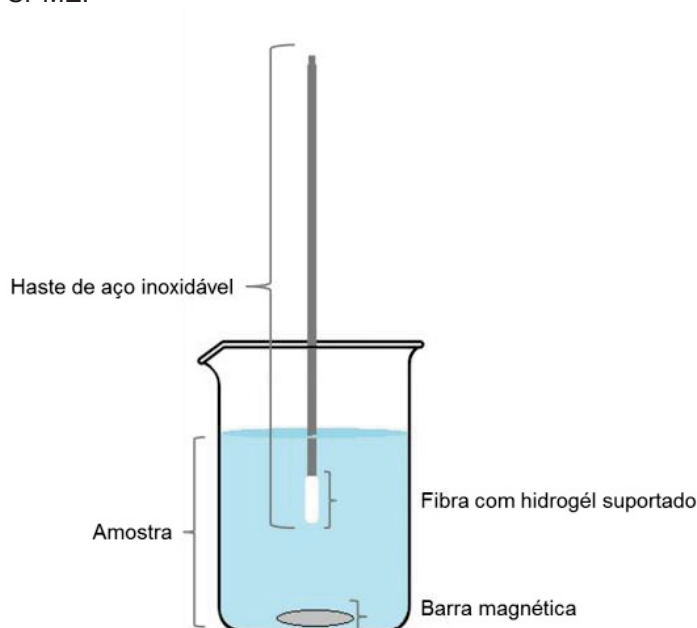
Primeiramente, em um béquer de 10 mL preparou-se 4,0 mL de solução aquosa de alginato a 1,0 ou 2,0% (m/v), adicionando-se quantidade pertinente a cada experimento da solução de zeína preparada em solvente misto, sendo estes água e etanol (70:30 (v/v) (Shukla; Cheryan (2001))), a uma concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. A dispersão formada foi agitada a uma temperatura de 60°C até visual homogeneização.

As fibras comerciais (fibras PP) foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1,5 cm de comprimento cada uma. Em seguida, foram condicionadas em acetona por 5,0 min, em banho ultrassônico. Posteriormente, em um béquer de 10 mL, contendo a solução pertinente de hidrogel, foram imersos 10 pedaços de fibra, para impregnação do hidrogel de forma simultânea, sob agitação magnética por 2,0 h a uma temperatura de 60°C .

Após esta etapa, foram inseridas barras de aço inoxidável (neste trabalho foram reutilizados êmbolos de microseringas de GC), de diâmetro de 0,5 mm, no interior do

lúmen da fibra oca, construindo-se o chamado disposto *labmade* SPME (FIGURA 7). O excesso de material foi removido com suaves movimentos nas barras de aço inoxidável. Em seguida, o conjunto SPME, constituído por fibra PP-hidrogel, foi obtido por imersão total do dispositivo em uma solução de cloreto de cálcio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ durante 2,0 h, para reticulação. Por fim, lavou-se cuidadosamente o dispositivo com água ultrapura, e este pôde ser utilizado para as etapas de extração e/ou as experiências de caracterização físico-química do material.

FIGURA 7: Esquema representando a conjunto *labmade* SPME.



4.2.4 Avaliação das Etapas de Extração e Dessorção

Em um primeiro momento, a extração foi realizada de forma a obter resultados qualitativos entre experimentos, para fins de comparação entre os hidrogéis sintetizados. Nessa etapa, em béqueres de 10 mL adicionou-se 1,0 mL da solução mix $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ e 500 μL do padrão interno (BPA-d16) a uma concentração de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$. Em seguida, o solvente foi evaporado com baixo fluxo de ar proveniente de bomba a vácuo. Foram então adicionados aos béqueres uma quantidade de 3,0 g de NaCl (30% (m/v)), 10,0 mL de água ultrapura e, após dissolução do sal sob agitação magnética, o pH foi ajustado para 4,0 através da adição de pequenos volumes de solução de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

O dispositivo contendo a haste de aço inoxidável, a fibra PP e o hidrogel de interesse foi então inserido no interior do béquer para a etapa de extração, onde permanecia sob agitação mecânica (aproximadamente 1200 rpm), a 50°C por 30,0 min. Decorrido esse tempo, a fibra PP contendo o hidrogel e os analitos extraídos foi colocada dentro de um *insert* de 200 μL onde foram adicionados 190 μL de metanol. Em seguida, o

vial contendo o *insert* foi levado para o banho ultrassônico onde permaneceu por 60,0 min para que ocorresse a etapa de dessorção de forma quantitativa. A fim de avaliar o efeito de memória, uma segunda dessorção com a mesma fibra foi conduzida, em um novo *insert* com outros 190 µL de metanol.

Com a seleção do hidrogel realizada (composição e proporção), fez-se necessário otimizar as variáveis presentes nas etapas de extração e de dessorção – pH de extração, força iônica de extração, tempo de extração, temperatura de extração e tempo de dessorção. Dessa maneira, optou-se por realizar planejamentos Plackett-Burman exploratórios e fatorial 2^3 com configuração em estrela para a escolha da condição de compromisso a ser utilizada (Ribeiro Junior *et al* (2013) e Rodrigues (2014)).

As variáveis foram selecionadas a partir da necessidade e possibilidade de se investigar a melhor condição de extração e dessorção, além de menor tempo e menor custo do processo. A TABELA 5 apresenta os valores explorados para cada variável referente a primeira otimização. Para tal, o planejamento Plackett-Burman foi realizado em dois níveis (superior (+) e inferior (-)), com quintuplicata do ponto central, de acordo com o delineamento observado na TABELA 6. Nessa mesma tabela, dá-se destaque às variáveis que foram utilizadas nos ensaios.

TABELA 5: Níveis codificados das variáveis do planejamento Plackett-Burman para otimização da etapa de extração e dessorção dos analitos presentes na fibra PP-hidrogel.

	nível -	ponto central	nível +
X1 pH de extração	4,0	6,0	8,0
X2 Força iônica de extração (%)	0,5	1,25	3,0
X3 Tempo de extração (min)	30,0	45,0	60,0
X4 Temperatura de extração (°C)	30	40	50
X5 Tempo de dessorção (min)	60,0	90,0	120,0

TABELA 6: Matriz do delineamento Plackett-Burman com permutagem à esquerda.

Ensaio	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Com os resultados obtidos mostrou-se necessária uma segunda otimização, onde utilizou-se o planejamento fatorial 2^3 com configuração em estrela para melhor atender as necessidades. As variáveis estudadas e seus valores foram selecionados a partir da primeira otimização, e os pontos em estrela de acordo com a regra de interpolação da matemática, podendo estes serem observados na TABELA 7. O planejamento foi realizado em dois níveis (superior (+) e inferior (-)), com quintuplicata do ponto central, como se observa na TABELA 8. Os resultados foram tratados e gerados no software *Statistica*® versão 7.0.

TABELA 7: Níveis codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^3 com configuração em estrela para otimização da etapa de extração e dessorção dos analitos presentes na fibra PP-hidrogel.

	nível -1,68	nível -	ponto central	nível +	nível +1,68
X1 Força iônica de extração (%)	21,6	25,0	30,0	35,0	38,4
X2 Temperatura de extração (°C)	23	30	40	50	56
X3 Tempo de dessorção (min)	34,8	45,0	60,0	75,0	85,2

TABELA 8: Matriz do delineamento fatorial 2^3 com configuração em estrela.

Ensaio	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0

Por fim, também se mostrou necessário avaliar, de forma univariada, o volume de extração (10,0, 50,0, 100,0 e 150,0 mL) e o número de etapas (de 1 a 5 etapas) de dessorções necessárias para uma eficiência de ao menos 95% (em termos de área de pico) dos analitos extraídos.

4.2.5 Avaliação da Fase Aquosa Remanescente da Extração

Para avaliar a irreversibilidade do processo de sorção pelo qual o dispositivo foi submetido, realizou-se um procedimento de extração líquido-líquido após o procedimento descrito na metodologia da seção 4.2.4. Para esta etapa, foram adicionados 500 μL da fase aquosa remanescente em um frasco *Eppendorf* com 300 μL de acetato de etila, como fase extratora orgânica. Após agitação vigorosa com auxílio de vórtex, o extrato foi deixado em repouso até a separação completa das fases. Uma alíquota da fase orgânica de 100 μL foi retirada e transferida para um *insert* de 200 μL . As etapas subsequentes de secagem, derivatização e injeção foram as mesmas empregas para as amostras que passaram pela etapa de extração, como será apresentado a seguir.

4.2.6 Secagem das Amostras

O procedimento de secagem das amostras consistiu em colocar os extratos, de metanol ou de acetato de etila, em um forno com controle preciso de temperatura a 70°C até a evaporação completa dos solventes.

4.2.7 Derivatização das Amostras

A partir de dados experimentais de trabalhos da literatura, fez-se um estudo sobre a reação de derivatização dos analitos que possuem hidrogênios ativos livres (IBU, PTM, 4NP, 4OP, BPA, TRI, E1, E2, EE2, TES e E3). Para avaliar a eficiência desta etapa, foi feita experimentalmente a comparação das áreas de picos após a injeção no sistema GC-MS dos analitos não derivatizados com aqueles que passaram pela etapa de derivatização. Para isto, foram utilizadas soluções estoque de concentração 1,0 mg L⁻¹.

Os derivatizantes testados foram três: BSTFA (Liu *et al* (2012); Shareef *et al* (2004) e Azzouz e Ballesteros (2012)), MSTFA (Quintana *et al* (2004) e Basheer *et al* (2005a)) e anidrido acético (Bagheri; Saraji (2003) e Rodríguez *et al* (1996)). Destes, o que apresentou melhor resultado em termos de incremento de área de pico foi testado em uma nova análise com um catalisador, o TMSI (Zhou *et al* (2007) e Orata (2012)).

Experimentalmente, 100 µL da solução padrão individual de 1,0 mg L⁻¹ foi adicionado a um *insert* de 200 µL. Após secagem completa desta alíquota, adicionou-se 50 µL do agente derivatizante de interesse (que poderia ser BSTFA ou MSTFA ou MSTFA:TMSI 1,0 ou 0,10% (v/v)) ao extrato e agitou-se vigorosamente em vórtex por 10 s. A reação de derivatização ocorreu em forno com controle preciso de temperatura, a 60°C por 30,0 min. Posteriormente, evaporou-se novamente as amostras, reconstituiu-se com 100 µL de acetato de etila e, por fim, após agitação, 1 µL foi injetado no sistema GC-MS. Com intuito de eliminar a etapa de secagem do derivatizante, que pode acarretar em possíveis perdas dos analitos, foi avaliada também a possibilidade da adição de 50 µL de acetato de etila diretamente ao extrato derivatizado (de volume 50 µL), com posterior injeção no sistema GC-MS. Com a condição de compromisso definida deu-se seguimento ao trabalho.

Para a reação de derivatização utilizando anidrido acético a metodologia transcorreu individualmente para cada analito da seguinte maneira: em um *insert* de 500 µL adicionou-se 50 µL da solução padrão individual de 1,0 mg L⁻¹, 100 µL da solução de hexano:anidrido acético (90:10 (v/v)) e 100 µL de uma solução aquosa de carbonato de potássio 5,0% (m/v). Após homogeneização e, com o auxílio de uma micropipeta, foram

coletados 50 µL da fase orgânica sobrenadante (hexano) e transferidos para um *insert* de 200 µL, sendo, então, injetado 1 µL no sistema GC-MS de cada um dos extratos.

Com o agente derivatizante selecionado, fez-se o estudo da otimização das variáveis com a finalidade de otimizar as condições da reação de derivatização dos compostos em estudo. Para isso, a solução mix de 25,0 mg L⁻¹ foi utilizada para avaliar os seguintes parâmetros: volume do derivatizante, tempo e temperatura de reação. Realizou-se um planejamento fatorial 2³ em dois níveis (superior (+) e inferior (-)), com triplicata no ponto central. As variáveis foram selecionadas a partir de estudos anteriores (Basheer *et al* (2005); Dallegrave (2012) e Quintana *et al* (2004)).

A TABELA 9, apresenta os níveis das variáveis do planejamento fatorial 2³. Posteriormente, foi necessário melhor avaliar as novas condições de estudo, as quais estão descritas na TABELA 10.

TABELA 9: Níveis codificados das variáveis do planejamento fatorial 2³ para otimização da reação de derivatização.

	nível -	ponto central	nível +
Temperatura da derivatização (°C)	40	50	60
Tempo de derivatização (min)	30,0	45,0	60,0
Volume do derivatizante (uL)	30	40	50

TABELA 10: Níveis codificados das variáveis do planejamento fatorial 2³ para otimização da reação de derivatização.

	nível -	ponto central	nível +
Temperatura da derivatização (°C)	60	65	70
Tempo de derivatização (min)	20,0	25,0	30,0
Volume do derivatizante (uL)	30	40	50

4.2.8 Sistema Cromatográfico

Durante este trabalho foi utilizado um cromatógrafo a gás modelo *GCMS2010 Plus* (Shimadzu®, Japão) hifenado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo *TQ8040* e autoamostrador *AC 5000* para análises de líquidos voláteis, *headspace* e SPME.

A otimização do método MRM foi realizada para determinar as energias de colisão e as transições de íon precursor para íon produto que resultariam em uma melhor resposta para cada analito, ou seja, maior intensidade de pico. Para isso, injetou-se 1 µL de uma solução padrão contendo todos os analitos a uma concentração de 2,0 mg L⁻¹, em acetato de etila, a qual foi analisada pelo modo *full scan*. Em seguida, analisou-se os espectros de massas de cada analito e os sinais de maior estabilidade e intensidade relativa foram os selecionados como íons precursores. A partir da seleção desse íon, avaliaram-se três transições íon precursor > íon produto, sendo a mais intensa

selecionada com a finalidade de quantificação e as outras duas de confirmação do analito. A varredura dos íons produtos foi realizada dentro do intervalo de m/z de 75 ao valor de m/z do íon precursor do analito subtraindo-se 1,5 m/z . A diferença de potencial aplicado foi com intervalos de 3 V, dentro de uma faixa de 1 a 51 V. As demais condições do equipamento está descrita na TABELA 11. A Rampa 1 foi utilizada nos ensaios preliminares, já a Rampa 2 para a etapa de otimização, análise dos parâmetros de mérito e para amostras reais.

TABELA 11: Condições de análise do GC-MS/MS.

Injetor	Temperatura do injetor	250°C
	Volume de injeção	1 µL
	Modo de injeção	<i>Split</i> 1:10
GC	Coluna	SH-Rtx-5ms (Shimadzu) 30,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm
	Gás de arraste	He (5.0)
	Vazão do gás de arraste	1,0 mL min ⁻¹ (vazão constante)
	RAMPA 1	RAMPA 2
	Coluna: 100°C (2 min)	Coluna: 100°C
	R1: 10°C min ⁻¹ até 160°C (2 min)	R1: 50°C min ⁻¹ até 160°C
Rampa de aquecimento	R2: 5°C min ⁻¹ até 210°C	R2: 10°C min ⁻¹ até 235°C
	R3: 10°C min ⁻¹ até 280°C	R3: 5°C min ⁻¹ até 245°C
	R4: 5°C min ⁻¹ até 300°C (1 min)	R4: 50°C min ⁻¹ até 285°C
	R5: 10°C min ⁻¹ até 320°C (4 min)	R5: 10°C min ⁻¹ até 310°C (2 min)
TQMS	Temperatura linha de transferência	300°C
	Temperatura do detector	250°C
	Analizador de massas	Triplo quadrupolo
	Energia de ionização	35 eV
	Modo de registro dos íons	<i>Full Scan</i> , SIM e MRM*

* O modo de registro de íons depende da etapa a ser avaliada.

4.2.9 Caracterização Físico-química do Hidrogel de Interesse

Diversos testes foram realizados para melhor compreender as características do hidrogel selecionado, neste caso, o de composição alginato(2,0%):zeína 99:1 (v/v), e assim, poder entender como o processo de extração e dessorção dos analitos, com distintas polaridades, se comporta. Pela facilidade de operação e pela não necessidade de suportar o hidrogel na fibra oca, os primeiros testes de caracterização foram realizados com o hidrogel na forma de esferas. Para isso, a dispersão de alginato e zeína foi gotejada com o auxílio de uma seringa de 0,5 mL em um béquero contendo a solução de cloreto de cálcio 0,10 mol L⁻¹. As esferas, que foram formadas de modo instantâneo e, em seguida, foram lavadas com água ultrapura. O mesmo procedimento foi realizado com a dispersão de alginato puro. Com intuito de secar totalmente as esferas de hidrogel, quando necessário, estas foram conduzidas à estufa para completa desidratação a uma

temperatura de 40°C. Primeiramente realizou-se a observação da estabilidade das esferas de hidrogel frente a diferentes pHs.

Posteriormente, realizou-se a caracterização termogravimétrica do hidrogel seco e dos seus dois componentes, isto é alginato e zeína puros. As substâncias foram analisadas, neste caso, no tocante ao seu comportamento de degradação térmica. Utilizou-se aproximadamente 75,00 mg de amostra, sendo empregado um analisador térmico simultâneo para a realização das medidas (*Netzsch*[®], modelo *STA 449 F3 Jupiter*), empregando N₂ como gás de purga a uma vazão de 50 mL min⁻¹. As experiências foram conduzidas de 25 a 900°C a uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹.

A caracterização dos hidrogéis por microscopia eletrônica de varredura (MEV ou do inglês, *Scanning Electron Microscope* – SEM) iniciou-se com a metalização das amostras no equipamento *Balzers Union*[®], modelo *SCD 030*, e prosseguiu-se com as observações através de um microscópio eletrônico de varredura *JEOL*[®], modelo *JSM-6360LV*, a 10 kV.

Para os experimentos de espectroscopia de infravermelho empregou-se a técnica de reflectância total atenuada (IS-ATR) em que os espectros no infravermelho médio (MIR) foram obtidos à temperatura ambiente (25°C) em um espectrofotômetro de curvatura *Bruker Optics*[®] equipado com uma célula de seleneto de zinco, um detector DTGS (sulfato de triglicina deuterado) e acessório de reflectância total atenuada. As medidas foram controladas pelo software *OPUS*[®] versão 5.0.

O estudo da porcentagem de perda de água do hidrogel, também conhecida como sinerese, foi realizado em duas temperaturas: 4 e 20°C. Os géis utilizados foram os que não passaram por desidratação, assim eram ligeiramente pressionados contra um papel absorvente para remover o excesso de fluido antes de cada observação. Determinou-se a massa pesando-se as amostras (em triplicata) a cada 30,0 min durante 400,0 min. A porcentagem de perda de água foi calculada pela EQUAÇÃO 1 (Lopes (2016)):

$$\text{Perda de água (\%)} = \left[\frac{(W_{eq} - W_t)}{W_{eq}} \right] 100$$

EQUAÇÃO 1

onde W_{eq} é a massa do hidrogel completamente inchado no equilíbrio e W_t é a massa do hidrogel em um dado tempo t .

Para a determinação do grau de intumescimento (do inglês *swelling index* – SI (%)), amostras dos hidrogéis secos foram imersas em 50 mL de água ultrapura. As medidas de massa foram realizadas e monitoradas até que se atingisse um valor constante. Antes da pesagem, os hidrogéis eram ligeiramente pressionados contra um papel absorvente para remover o excesso de fluido não absorvido. Tal estudo foi

realizado em triplicata, sendo possível obter valores de SI em porcentagem, segundo a EQUAÇÃO 2 (Lopes (2016)) abaixo:

$$\text{Índice de intumescimento (\%)} = \left[\frac{(W_f - W_i)}{W_i} \right] 100$$

EQUAÇÃO 2

onde W_f é a massa final do hidrogel após hidratação em certo tempo e W_i , a massa do hidrogel seco.

A permeabilidade do hidrogel foi determinada da seguinte maneira: em tubos de ensaios diferentes reticulou-se o alginato (2,0%) (m/v) e o alginato(2,0%):zeína 99:1 (v/v) de forma a obter-se uma substância gélica de altura de 3,0 cm com diâmetro de 1,0 cm. Desta forma, 50 µL de solução de azul de metileno 0,15 mg L⁻¹ foi vertido sobre a parte superior dos géis. A migração, em mm, do corante dentro do gel foi monitorada visualmente e mensurada com o auxílio de uma régua.

4.2.10 Análise dos Parâmetros de Mérito

Os parâmetros de mérito foram avaliados segundo as orientações encontradas no guia *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis* (Thompson *et al* (2002)) que segue as orientações da IUPAC de 2002 e a Resolução nº 166, de 25 de julho de 2017 (ANVISA (2017)).

4.2.10.1 Linearidade

Avaliou-se a linearidade no intervalo de concentração de 0,1 a 100,0 µg L⁻¹ para a maioria dos analitos, as exceções foram PTM e E3 (0,5 a 100,0 µg L⁻¹). Para isto, água ultrapura enriquecida com os diferentes compostos em diferentes concentrações, respeitando a faixa mencionada anteriormente, juntamente com o padrão interno (BPA-d16 10,0 µg L⁻¹) foram extraídos e dessorvidos segundo as condições desenvolvidas na metodologia e analisadas pelo sistema GC-MS/MS, no modo MRM e SIM, em triplicata.

4.2.10.2 Limite de quantificação e limite de detecção

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido como sendo a menor concentração quantificável com precisão (desvio padrão relativo < 20% (do inglês *Relative Standard Deviation* – RSD)) e exatidão (entre 80 e 120%).

O limite de detecção (LD) é considerado a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Para isto, foi considerado a concentração correspondente a um sinal/ruído no cromatograma igual a 3.

4.2.10.3 Precisão

Avaliou-se a precisão através de intra-ensaios e inter-ensaios. Para as análises de intra-ensaios foram realizadas extrações em triplicatas, em um mesmo dia, com água ultrapura enriquecida com os analitos em três níveis de concentração: nas concentrações próximas do LQ, na região central da curva analítica e na região de maior concentração da curva analítica. Para as análises de inter-ensaios, amostras de água ultrapura enriquecidas com os analitos, nos mesmos três níveis de concentração descritos anteriormente para os intra-ensaios, foram extraídas em três dias distintos. A precisão foi expressa em termos de RSD.

4.2.10.4 Exatidão

Ainda nos mesmos 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto), foi determinada a exatidão do método proposto. A exatidão foi expressa pela razão entre a concentração medida experimentalmente e a concentração teórica ($\times 100$ para expressão em porcentagem). Neste trabalho, o parâmetro de recuperação foi avaliado como exatidão.

4.2.10.5 Repetibilidade

A repetibilidade da metodologia foi avaliada por meio do RSD obtido para cada composto de interesse no estudo de reutilização do dispositivo de fibra PP-hidrogel. Dessa maneira, foram realizadas 5 extrações, sob as mesmas condições, utilizando-se a mesma fibra. Para que isso fosse possível, adicionou-se um passo de lavagem das fibras entre as extrações, sendo este combinado por uma lavagem com acetona em ultrassom durante 5,0 min, seguida por outra lavagem com hexano por 5,0 min e finalmente um passo de reidratação com uma solução de cloreto de cálcio de concentração $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ durante 20,0 min. Tal etapa teve como objetivo evitar efeito de memória (no inglês *carryover*) entre as extrações consecutivas. Para constatar a integridade do hidrogel após a extração e dessorção dos analitos, imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) foram feitas logo após a primeira etapa de extração e dessorção, como será

apresentado no tópico referente a caracterização do dispositivo. Tal resultado pode, de certa maneira, expressar a robustez do dispositivo/fase extratora desenvolvida.

4.2.10.6 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade da técnica foi avaliada através dos ensaios de precisão, uma vez que as extrações e dessorções realizadas empregaram fibras PP-hidrogel distintas.

4.2.10.7 Robustez da fibra

Para avaliar a reutilização e, conseqüentemente, a robustez do dispositivo, foram realizadas 5 extrações subsequentes com a mesma fibra nas mesmas condições de extração e análise (item 4.2.4).

4.2.10.8 Estabilidade das soluções

A estabilidade dos analitos nas soluções padrão (metanol) foram avaliadas em nível de concentração de $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$, levando-se em consideração as seguintes variações: estabilidade das soluções padrão após ciclos congelar e descongelar (estabilidade das soluções padrão) e estabilidade após processamento (extração e derivatização). O estudo da estabilidade das soluções padrão após ciclos de congelamento e descongelamento foi realizado concomitantemente aos estudos de otimização (aproximadamente pelo período de 1 ano), uma vez que, durante esta etapa as soluções foram alocadas em freezer (-20°C), armazenadas e passaram por inúmeras etapas de descongelar e congelar. Os dados de área de pico provenientes da injeção de tais amostras foram então comparados com as áreas de pico de cada um dos analitos quando recém preparados no mesmo solvente (metanol). No caso da estabilidade após processamento, foi realizada a comparação entre as intensidades dos picos antes e após o intervalo de tempo nas quais as amostras ficam armazenadas no injetor automático do equipamento. Para este fim, um intervalo de 24 h foi avaliado entre duas injeções sequenciais.

4.2.11 Aplicação do Método em Amostras de Águas Superficiais

Os recursos hídricos do município de Curitiba estão distribuídos em 6 sub-bacias hidrográficas, rio Atuba, rio Belém, rio Barigui, Ribeirão dos Padilha, rio Iguaçu e rio Passaúna, cuja qualidade encontra-se comprometida, devido ao crescimento da

metrópole que levou a uma ocupação desordenada contribuindo com a degradação desses recursos hídricos (IPPUC (2007)). Por este motivo, esta região foi selecionada como local de estudo para comprovar a eficiência da metodologia proposta por este trabalho.

O rio Belém é um dos principais rios de Curitiba, tendo 17,13 km de extensão, área de drenagem de 87,80 km², que equivale a aproximadamente 20% da área da cidade, 46 afluentes e alta densidade populacional estão presentes ao longo do curso do rio (Richa (2013)). Esse rio nasce no bairro Cachoeira, corta a cidade no sentido de norte a sul e tem sua foz no rio Iguaçu, no bairro Boqueirão, sendo então um dos afluentes da margem direita do rio Iguaçu (IPPUC (2007) e Sampaio (2017)).

Devido à bacia hidrográfica do rio Belém ser uma bacia urbana, esta sofre graves desequilíbrios ambientais, que são consequência de uma infraestrutura precária de esgotamento sanitário, ocupações irregulares em suas margens, descarte inadequado de lixo, desmatamento e alterações na forma original do rio, como o confinamento do seu leito e a impermeabilização do solo (IPPUC (2007) e Sampaio (2017)).

Foram coletadas amostras de águas do rio Belém em três pontos, sendo o primeiro localizado a 500 m da nascente, próximo ao Parque das Nascentes do Belém; o segundo ponto, a 5,4 km da nascente, encontra-se ao lado do Parque São Lourenço; e o terceiro ponto de coleta está localizado a montante da ETE Belém. A TABELA 12 traz as coordenadas geográficas de cada ponto amostrado e a FIGURA 8 representa o mapa da localização da bacia hidrográfica do rio Belém com os pontos de amostragem identificados em vermelho.

TABELA 12: Localização geográfica dos pontos de coleta na bacia hidrográfica do rio Belém.

Ponto	Longitude	Latitude
Ponto 1	49° 16' 08".964 W	25° 21' 13".407 S
Ponto 2	49° 16' 00".365 W	25° 23' 15".380 S
Ponto 3	49° 12' 54".156 W	25° 30' 26".753 S

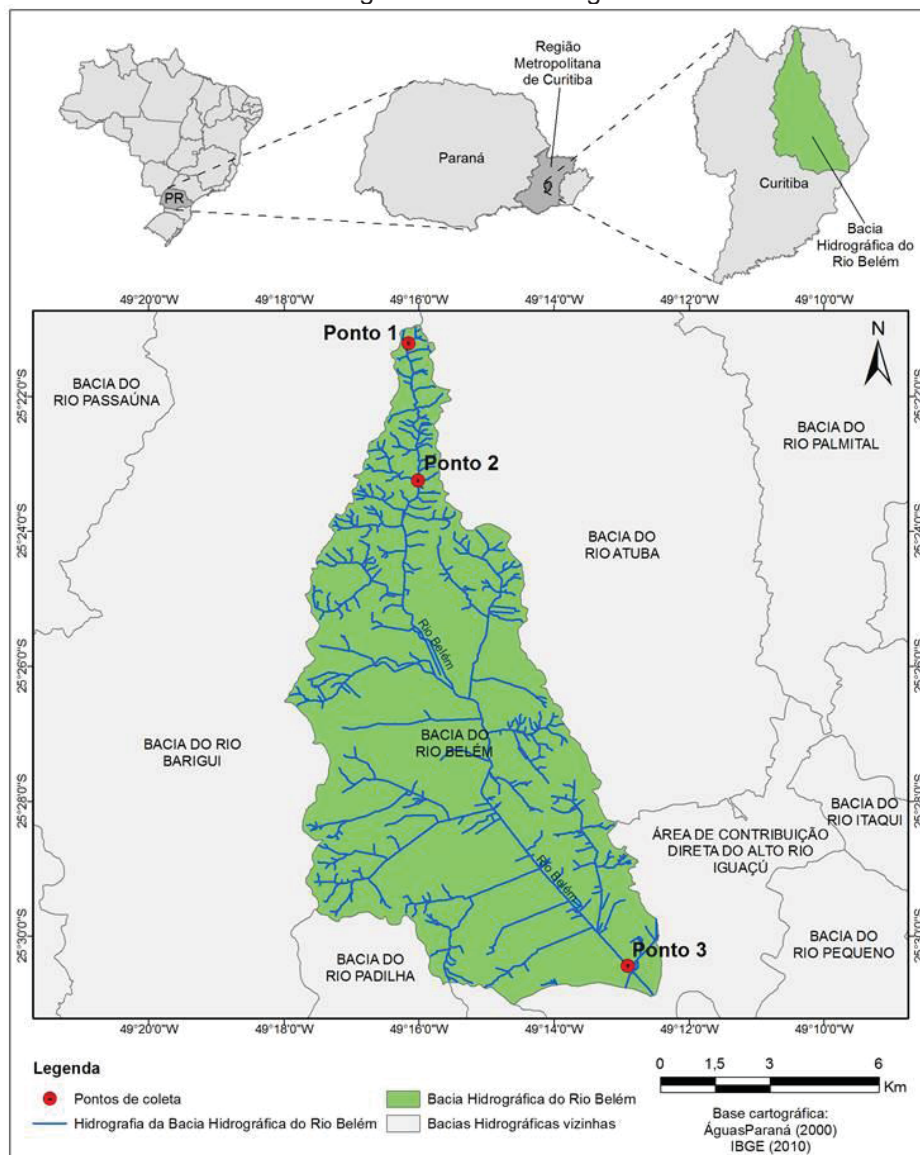
Sistema de Coordenadas Geográficas: *Google Maps*.

Para a coleta propriamente dita foram necessários materiais como baldes e cordas de longo alcance. As amostras coletadas foram armazenadas em frascos de vidro âmbar de 4,0 L previamente descontaminados. Para a remoção do material particulado, filtrou-se as amostras em membranas de fibra de vidro com diâmetro de poro de 0,45 µm. A extração dos analitos foi realizada em até 24 h após a coleta das amostras, período no qual estas ficaram armazenadas em frascos de vidro âmbar a 4°C.

Anteriormente à extração, adicionou-se nas amostras o padrão interno para obter-se uma concentração final de 10,0 µg L⁻¹. A extração prosseguiu de acordo com a

condição de compromisso pré-estabelecida, ou seja, consistiu em adicionar em um béquer de 100 mL, 17,5 g de NaCl (35,0% m/v) e 50,0 mL de amostra aquosa. Sob agitação mecânica (aproximadamente 1200 rpm) e controle de temperatura (50°C), os dispositivos SPME (fibra PP-hidrogel – alginato(2,0%):zeína 99:1 (v/v)) foram inseridos por um tempo de 30,0 min para que a extração se procedesse. Em seguida, os dispositivos foram retirados e secos cuidadosamente com leves movimentos e introduzidos em *inserts* de volume 200 µL com uma quantidade de 190 µL de metanol. O processo de dessorção, em banho ultrassônico, foi realizado por 45,0 min. Uma segunda dessorção dos analitos com a mesma fibra foi conduzida, nas mesmas condições e em *inserts* diferentes. Por fim, as amostras foram secas em estufa com controle preciso de temperatura a 70°C e derivatizadas a 60°C por 30,0 min. Posteriormente, 1,0 µL de cada amostra foi injetada no sistema GC-MS/MS.

FIGURA 8: Pontos de amostragem na bacia hidrográfica do rio Belém.



FONTE: Sampaio (2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ETAPA DE DERIVATIZAÇÃO

Previamente aos estudos relacionados à síntese dos hidrogéis fez-se necessário averiguar e otimizar as etapas com relação às condições cromatográficas, para identificar os tempos de retenção dos analitos investigados, assim como, obter melhores resultados com relação a intensidades e áreas de picos.

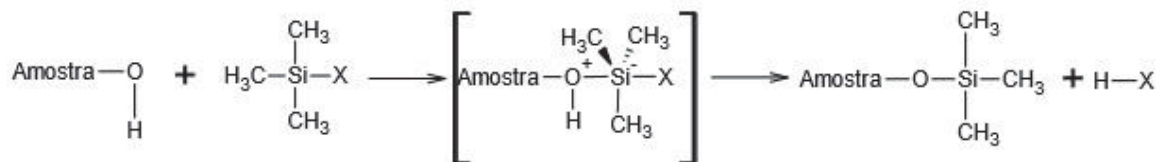
Com relação as condições cromatográficas, primeiramente, buscou-se estudar o sistema GC-MS em termos de vazão e rampa de aquecimento, de modo que a resolução cromatográfica pudesse ser alcançada no menor tempo possível de corrida. Como já era previsto que a etapa de derivatização fosse crucial para melhores resoluções dos picos, iniciou-se avaliando este parâmetro. Para isto, realizou-se a derivatização com cada um dos analitos em separado com os reagentes avaliados (BSTFA, MSTFA e anidrido acético), a fim de verificar a eficiência da reação, o tempo de retenção dos compostos e seus respectivos espectros de massas. Nesta etapa o acompanhamento da resposta por GC-MS foi realizada no modo *full scan* e SIM (fragmentos selecionados descritos na TABELA 13). Dos 14 analitos investigados 3 não são passíveis de derivatização, sendo eles a ATZ, a PRO e a CAF, uma vez que não possuem hidrogênios livres em grupamentos polares, como observado nas estruturas químicas já apresentadas na seção 2.1. Nestes casos, a identificação destes analitos foi realizada a partir de suas respectivas *m/z* originais. Os demais analitos possuem em sua estrutura grupamentos susceptíveis à derivatização, em sua maioria, hidrogênios dos grupos fenólicos, que apresentam uma elevada polaridade e pouca volatilidade como já foi observado em outros trabalhos da literatura (Becker (2012)).

Ao empregar-se o reagente anidrido acético os produtos da reação de derivatização eram de difícil compreensão dos resultados, pois a biblioteca utilizada pelo *software*, *Nist 05*, não possui os compostos derivatizados, ou seja, os analitos com os hidrogênios livres substituídos pelo grupo acilo, o que prejudicou as análises qualitativas (Orata (2012)) e conclusões fidedignas com relação ao desempenho desta etapa. Com intuito de evitar a necessidade da construção de uma biblioteca exclusiva para os compostos derivatizados com o anidrido acético, optou-se por investigar o BSTFA e o MSTFA como agentes derivatizantes.

Como pode-se observar na FIGURA 9, a reação de derivatização, quando BSTFA ou MSTFA foram utilizados como agentes derivatizantes, ocorre através de um ataque nucleofílico do tipo SN2. Portanto, para os analitos monitorados nesse trabalho, a reação de derivatização corresponde à substituição do hidrogênio livre ativo de um grupo polar

(-OH) por um grupamento a base de organosilano, para esses casos em específico, o grupo trimetilsilil.

FIGURA 9: Mecanismo geral da reação de sililação, onde X varia de acordo com o tipo de derivatizante utilizado.



FONTE: Modificado de Dallegrave, 2012.

Decorridas as reações de derivatizações com os reagentes MSTFA e BSTFA, pôde-se montar, parcialmente, a TABELA 13 com as informações a respeito de cada um dos analitos, ou seja, tempo de retenção, íon molecular e análise dos principais fragmentos, os quais foram comparados com dados da literatura.

Ao se empregar os reagentes BSTFA e MSTFA houve, visualmente, um aumento significativo na área dos picos dos cromatogramas comparados aos não derivatizados, causando fácil identificação dos analitos. Um fato que percebeu-se durante os experimento foi que alguns dos analitos possuem mais de um hidrogênio ativo onde grupos silanos, neste caso, trimetilsilanos (TMS), poderiam ser adicionados ao composto de interesse. Existem analitos que são monosubstituídos (entrada de 1 grupo TMS), como é o caso da TES; analitos que são disubstituídos (entrada de 2 grupos TMS), E2 e BPA; e trisubstituídos (entrada de 3 grupos TMS), E3. De acordo com a literatura, nem sempre a reação de sililação gera somente um produto (Dallegrave (2012)), como pode ser o caso da E2, e de outros analitos, que podem gerar o produto tanto na forma monosubstituída, como na forma disubstituída. Isso ocorre devido a um impedimento estérico, que dificulta a reação de substituição do hidrogênio livre ativo pelo grupo silano (Becker (2012)). Em muitos casos é utilizado um catalisador para que a reação de substituição seja eficiente, ou seja, que todo o analito tenha seu hidrogênio ativo substituído por um grupo silano, e assim, se converta a uma única forma; a exemplo tem-se o caso do analito E2, em que esperava-se que todo E2 fosse convertida na forma disubstituída do composto, mas encontrou-se picos referentes o E2 monosubstituído.

De acordo com a literatura, a sililação do EE2 usando MSTFA em acetato de etila, acetonitrila e diclorometano produz o 3-mono-TMS-EE2, que é instável, devido a um processo que conduz à formação de estrona derivatizada, TMS-E1 (Arroyo *et al* (2007)). A formação de TMS-E1 a partir de 3-mono-TMS-EE2 acarreta falsos positivos de E1 e falsos negativos de EE2, o que dificulta a quantificação EE2 e E1 presente nos ensaios experimentais e futuramente nas amostras.

TABELA 13: Parâmetros cromatográficos (GC-MS/MS).

Analito	t _r (min) R1; R2	Íon molecular* (g mol ⁻¹)	Principais Fragmentos (m/z)	Fragmentos Encontrados na Literatura (m/z)	Referência	Transição (m/z)	Energia de colisão (V)
IBU	12,73; 5,18	278	160, 263, 278	160, 177, 220, 263, 278	Becker (2012)	160,00>117,10	21
				73, 75, 160, 278, 289	Donike (1985)	160,00>145,10 160,00>91,10	12 30
PTM	15,34; 5,25	298	106,280,298	206, 295, 299	Becker (2012)	206,00>73,10	21
				73, 206, 280, 293	Dalmázio (2008)	206,00>91,10 206,00>165,10	18 12
CAF**	17,29; 7,37	-	109, 194	55, 109, 195	Becker (2012)	109,00>55,10 109,00>82,10 109,00>94,10	9 6 18
4NP	18,92; 7,85	292	107, 220	31, 107, 135	Munaretto (2012)	179,00>73,10	18
				193, 221, 292	Figueiredo (2014)	179,00>58,00 179,00>105,10	42 12
4OP	16,89; 6,90	278	107,206	30, 107, 206	Munaretto (2012)	179,00>73,10	18
				179, 278	Figueiredo (2014)	179,00>58,00 179,00>105,10	42 12
BPA	13,52; 10,81	372	357	119, 167, 213, 357, 372	Becker (2012)	357,00>73,10	27
				357, 372	Szyrwińska (2007)	357,00>191,10 357,00>207,10	21 18
E1	27,72; 13,71	342	257, 342	218, 257, 342 (monosubstituída)	Dallegrove (2012)	342,00>257,10	18
				144, 270	Munaretto (2012)	342,00>244,10 342,00>73,10	18 30
E2	28,04; 13,91	416	285, 326, 416	285, 416 (disubstituído)	Dallegrove (2012)	285,00>73,10 285,00>205,10 285,00>229,10	27 18 21
EE2	29,06; 14,60	440	425,440	196, 285, 425 (disubstituído)	Dallegrove (2012)	425,00>193,10 425,00>167,20 425,00>231,10	21 21 21
E3	29,82; 15,13	504	385, 414	129, 345, 311, 504	Dallegrove (2012)	147,00>73,10	18
				(trisubstituído)		147,00>131,10 147,00>103,00	12 18
PRO**	29,59; 14,83	-	314	371, 386 (monosubstituída)	Dallegrove (2012)	91,00>65,10	18
				124, 229, 314	Dallegrove (2012)	91,00>63,00 91,00>51,00	21 27
TES	28,17; 14,07	360	270, 360	226, 270, 360	Erikssonsj (1988)	129,00>73,10	9
				226, 270, 345, 360	Campos (2005)	129,00>58,00 129,00>127,10	30 21
TRI	22,37; 10,00	361	344, 361	146, 218, 288, 347, 360	Becker (2012)	200,00>185,00	18
				200, 310, 347	Mottaleb (2009)	200,00>170,00 200,00>135,00	30 45
ATZ**	15,42; 6,36	-	200, 215	10, 173, 215	Munaretto (2012)	200,00>122,10 200,00>71,10 200,00>104,00	12 21 21

* Massa do íon molecular derivatizado.

** Neste estudo, cafeína, progesterona e atrazina não sofreram derivatização.

R1 = rampa 1; R2 = rampa 2.

Em negrito as transições e energias selecionadas para a quantificação no modo MRM.

É comum nas reações de derivatização a formação de diversos produtos (Dallegrove (2012)), e esse fenômeno foi observado nas reações que utilizavam os reagentes MSTFA e BSTFA, como pode ser constatado para o EE2 na FIGURA 10.

Porém, com o emprego do catalisador TMSI foi possível melhorar a especificidade da derivatização para EE2 como pode ser visualizado na FIGURA 11. Neste caso, foi avaliada a influência da quantidade, em porcentagem, do catalisador frente ao agente derivatizante. Dessa maneira, foram procedidas análises, sob as mesmas condições cromatográficas e parâmetros de derivatização, adicionando-se 0,10 e 1,0% (v/v) de TMSI ao agente derivatizante MSTFA. Como observa-se o pico presente no cromatograma da FIGURA 11 houve melhora significativa ao utilizar-se a maior concentração de catalisador frente a menor concentração, verificada pela maior intensidade do pico cromatográfico (na ordem de 3 vezes superior, como observa-se na legenda do eixo y), e decorrente deste resultado foi selecionada essa concentração, 1,0% (v/v). Segundo os resultados, o uso do catalisador TMSI na reação proporcionou uma rota preferencial para a reação de sililação, facilitando a captura dos hidrogênios livres ativos do sítio de reação, com formação de um produto dissubstituído de $m/z = 340$. Isso contribuiu para que a reação fosse completada em um menor tempo, gerando os produtos de interesse de forma seletiva.

FIGURA 10: Cromatograma parcial da análise dos produtos da derivatização da EE2 com o agente derivatizante MSTFA na ausência do catalisador, gerando TMS-E1 e TMS-EE2.

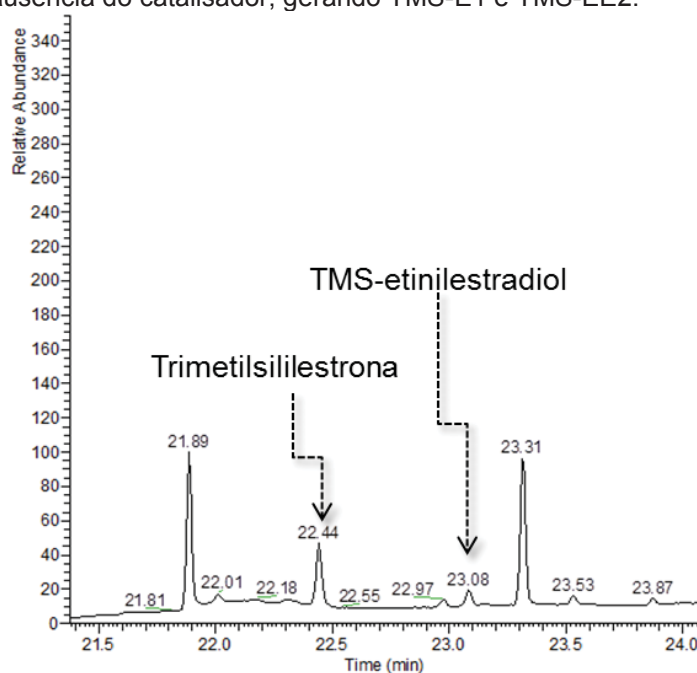
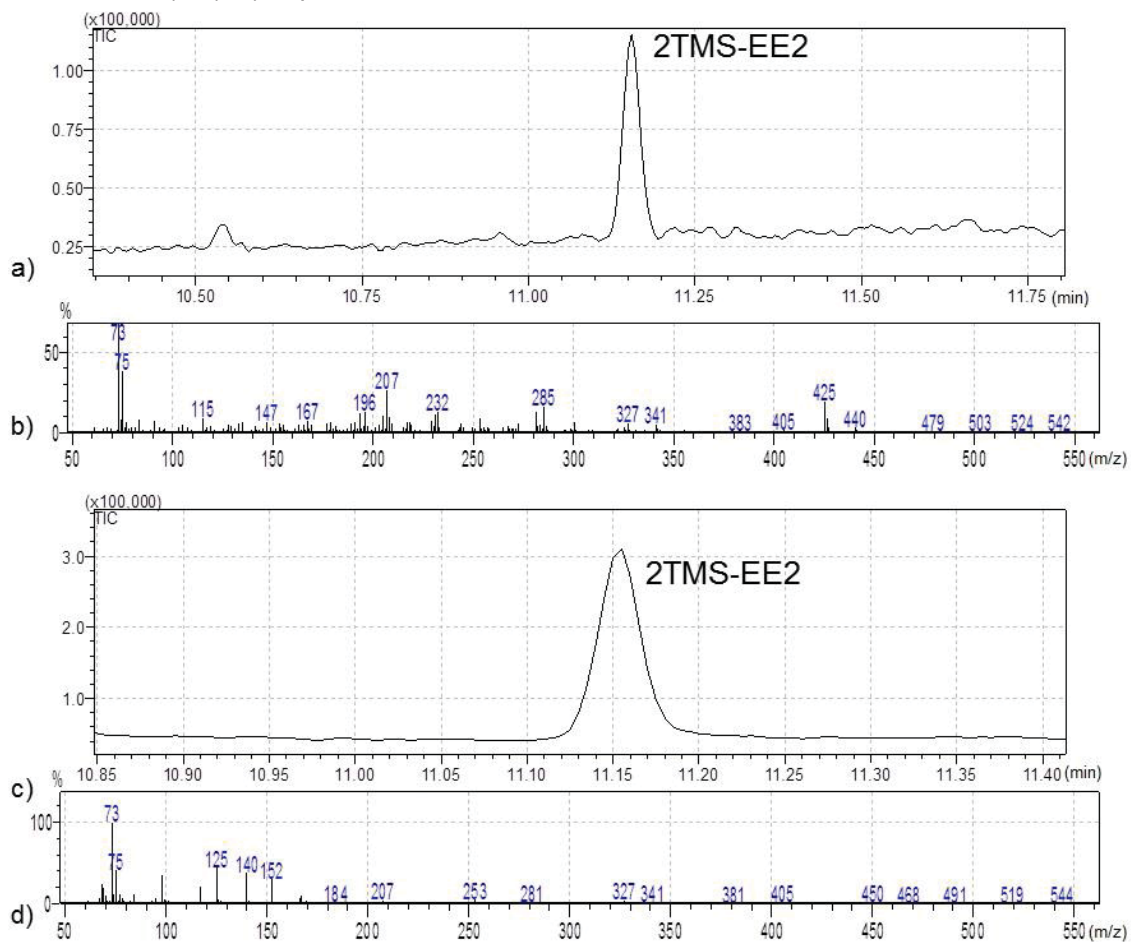
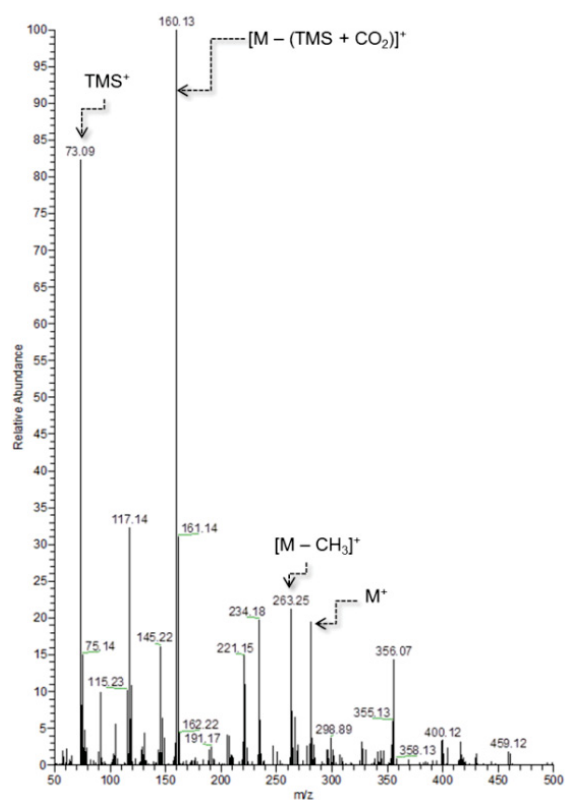


FIGURA 11: a) Cromatograma do produto da reação de EE2 com MSTFA:TMSI (0,1%), b) Espectro de massas do 2TMS-EE2, c) Cromatograma do produto da reação de EE2 com MSTFA:TMSI (1%), d) Espectro de massas do 2TMS-EE2.

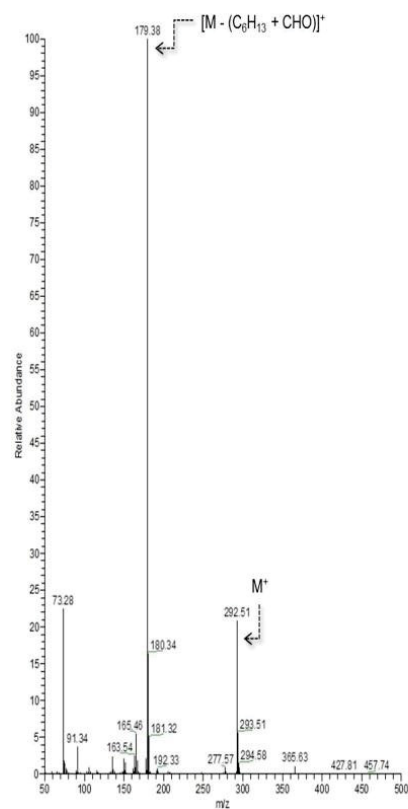


A FIGURA 12 apresenta alguns exemplos de espectros de massas dos analitos, sendo estes IBU, 4NP, BPA e E2, todos derivatizados com MSTFA:TMSI (0,1% (v/v)). Pôde-se verificar, de forma representativa, que os analitos que derivatizaram, ou seja, que sofreram a reação de sililação, possuem o fragmento característico m/z 73 que é referente ao grupo trimetilsilano ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

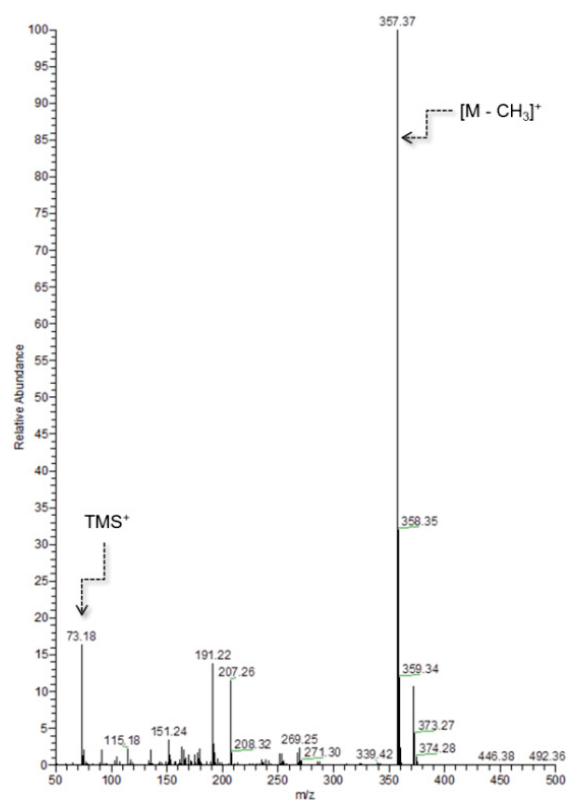
FIGURA 12: Espectros de massas representativos de alguns analitos derivatizados: a) IBU b) 4NP, c) BPA e d) E2.



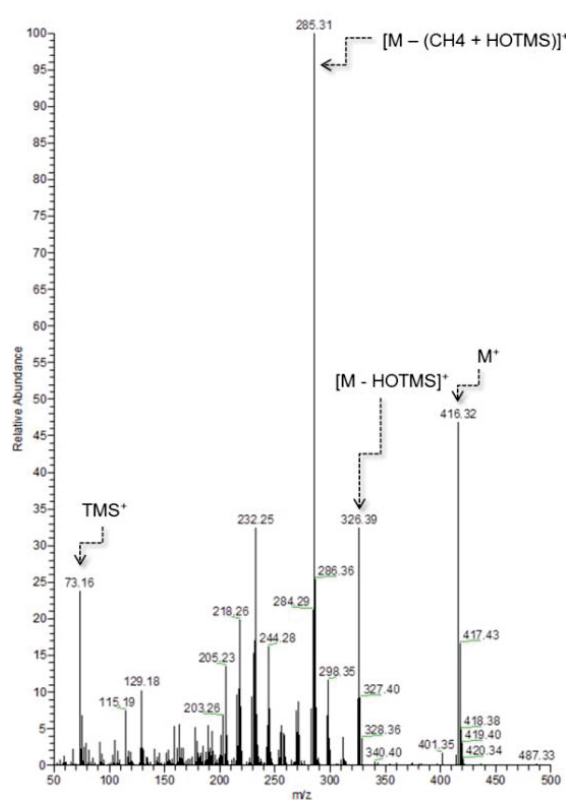
a)



b)



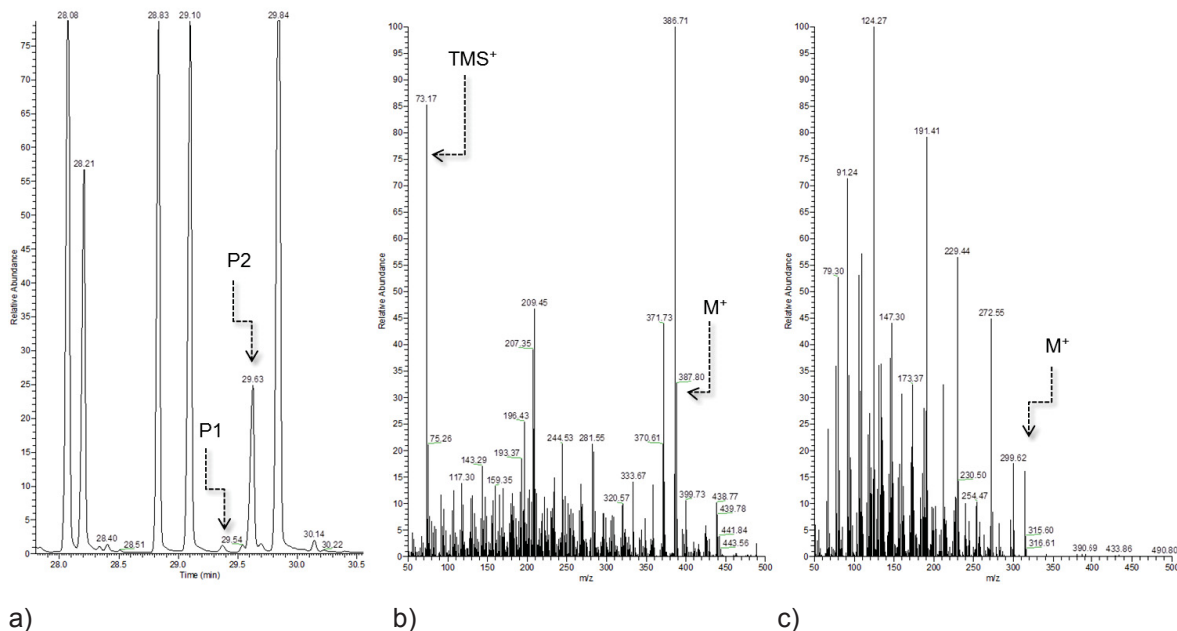
c)



d)

Um dos analitos de estudo, a PRO, não apresenta hidroxila, ou seja, hidrogênio livre ativo, em sua estrutura química, apenas carbonilas. Este fato impede a sua derivatização, mas ao utilizar o derivatizante MSTFA:TMSI foi possível observar um pico referente a PRO derivatizada (P1) e um pico mais intenso referente a PRO (P2), como ilustrado na FIGURA 13. A fração derivatizada, possivelmente, é caracterizada pela formação de um enol (Dallegrave (2012)). Como a PRO apresenta uma certa estabilidade térmica e baixa susceptibilidade às reações de derivatização, o pico referente a este analito foi selecionado como sendo aquele da estrutura não derivatizada.

FIGURA 13: a) Corte do cromatograma próximo da região de retenção do analito PRO; b) Espectro de massas da PRO após reação de derivatização (P1) com MSTFA:TMSI 0,1%; c) Espectro de massas da PRO não derivatizada (P2) após reação de derivatização com MSTFA:TMSI 0,1%. Sendo P1 no tempo de 22,54 min e P2 no tempo de 29,63 min.



Posteriormente, fez-se o estudo da solução mix de 25,0 mg L⁻¹ para verificar a resolução cromatográfica simultânea dos picos referentes aos analitos derivatizados com BSTFA, MSTFA e MSTFA:TMSI. Realizou-se os experimentos em triplicata, obtendo-se assim a média das áreas dos picos e os respectivos desvios padrões, que estão apresentados na TABELA 14. As análises foram realizadas considerando a aquisição de dados no modo *full scan*, ou de varredura, analisando uma faixa de íons de razão *m/z* entre 50 e 500. Com os resultados das análises individuais e também do mix foram verificadas as razões *m/z* mais intensas de cada analito (íon base) e outras duas razões *m/z* utilizada para confirmação, além dos tempos de retenção, estes resultados encontram-se também na TABELA 13.

TABELA 14: Obtenção da média das áreas ($\times 10^6$) e respectivos desvios padrões ($\times 10^6$) dos picos cromatográficos obtidos com diferentes agentes derivatizantes.

	Média BSTFA	Desvio BSTFA	Média MSTFA	Desvio MSTFA	Média MSTFA:TMSI*	Desvio MSTFA:TMSI*
IBU	44	28	27	35	74	27
PTM	104	81	83	62	123	15
CAF	26	17	21	9	35	2
4NP	93	64	75	45	125	15
4OP	87	58	72	49	122	16
BPA	183	124	95	89	210	21
E1	154	108	118	51	183	10
E2	218	150	188	82	295	31
EE2	97	71	125	67	268	30
E3	256	177	224	97	356	36
PRO	75	53	54	23	101	16
TES	131	95	94	43	181	22
TRI	66	45	46	20	70	11
ATZ	26	15	25	11	39	4
MÉDIA DO DESVIO PADRÃO		77		49		18

*na proporção de 99:1 (v/v).

O aumento verificado na massa molar (íon base ou íon molecular) dos analitos é decorrente da derivatização. Há uma troca de cada um dos hidrogênios ativos por um grupo TMS de m/z 73, com isso, o pico do íon molecular de cada um dos analitos que derivatizam aumenta. Os analitos IBU, PTM, TRI, 4NP, 4OP, E1 e TES têm substituição de 1 hidrogênio ativo por 1 grupo TMS, portanto sua massa molecular aumenta em 72. Os analitos BPA, E2 e EE2 possuem 2 hidrogênios ativos, com isso sua massa molecular aumenta em 144 unidades. O analito E3 possui 3 hidrogênios ativos, por isso sua massa molecular cresce em 216 unidades. Este aumento da massa molecular dos analitos não é só de interesse para garantir uma maior volatilidade aos compostos, mas também foi de extrema importância na próxima etapa do trabalho, onde foram estudadas as fragmentações no sistema MS/MS.

De modo geral, a análise dos compostos derivatizados e não-derivatizados, após etapa da análise por GC-MS, mostrou-se efetiva em termos de resolução cromatográfica e de controle reacional para originar produtos de fácil identificação para os próximos estudos.

Para comparar os 3 métodos propostos, ou seja, analisar se há diferença significativa entre os reagentes derivatizantes propostos, em termos de precisão analítica, comparou-se as estimativas de desvios padrão obtidos pelos 3 métodos testando-se a solução mix de $25,0 \text{ mg L}^{-1}$. Realizaram-se os experimentos em triplicata, utilizando-se o mesmo método no sistema GC-MS, SIM. Dessa maneira, obteve-se a média das áreas

dos picos e os respectivos desvios padrões para cada analito. Constatou-se que, maior intensidade dos picos e menor desvio padrão foram evidenciados quando o agente derivatizante MSTFA, na presença do catalisador TMSI, foi empregado. Estes resultados indicam que o catalisador não somente promoveu maior seletividade quando à reação de derivatização, mas também garantiu maior precisão entre as análises e incrementos significativos nos valores de áreas dos picos de todos os analitos, o que acarretará em menores limites de quantificação para o método proposto neste trabalho.

Casos em que pequenas intensidades e/ou áreas de picos eram apresentados tomaram preferência frente a analitos que não eram considerados problemas (que possuíam grande área de pico). Dessa forma, a TES, que apresentava pequena área de pico, tornou-se prioridade de observações nos cromatogramas. O derivatizante que apresentou menor desvio padrão para a TES também foi o que apresentou melhores desvios padrão para a maioria dos analitos, ou seja, MSTFA:TMSI, portanto, foi o reagente escolhido.

O BSTFA e o MSTFA, em geral, apresentaram uma variância elevada, calculada na ordem de 77 e 49%, respectivamente. Esse fato pode ser devido à segunda secagem do extrato não ser reprodutível e, dessa forma, perder os analitos já volatilizados para o meio, já que a secagem é realizada com o *vial* aberto. Já o derivatizante MSTFA com 1,0% de TMSI (v/v) apresentou uma variância de 18%. Ao empregar-se MSTFA:TMSI obteve-se melhor resolução cromatográfica e, o composto EE2 que antes (na presença de BSTFA ou MSTFA) era constituído por 2 picos, o mono e o di-substituído, agora se apresenta somente como di-substituído. Portanto, a derivatização utilizando o MSTFA:TMSI torna-se mais seletiva. Assim, o derivatizante selecionado foi o MSTFA:TMSI na proporção de 99:1 (v/v), que foi empregado para as próximas etapas deste estudo.

Para a otimização da etapa de derivatização, além dos reagentes, foram considerados os seguintes parâmetros: solvente, volume de solvente, tempo de reação e temperatura de reação. O solvente utilizado nas reações de derivatização é de grande importância, pois solventes que contenham hidrogênio ativo como álcoois, ácidos, aminas primárias e secundárias devem ser evitados, já que dependendo dos valores de pH do meio reacional, a protonação ou desprotonação destes poderá deixá-los susceptíveis à reação de derivatização. Solventes apolares como isooctano, hexano e éter têm sido comumente aplicados para reações de derivatização, porém não contribuem para que a reação ocorra de forma mais rápida. Já solventes mais polares apróticos como a dimetilformamida, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, acetato de amônio e acetato de etila são utilizados com maior frequência, pois tendem a facilitar a reação (Dallegrave (2012)).

Por estas razões, o acetato de etila, que além de ser um solvente compatível com o sistema GC-MS, foi o selecionado para a etapa de reconstituição dos extratos.

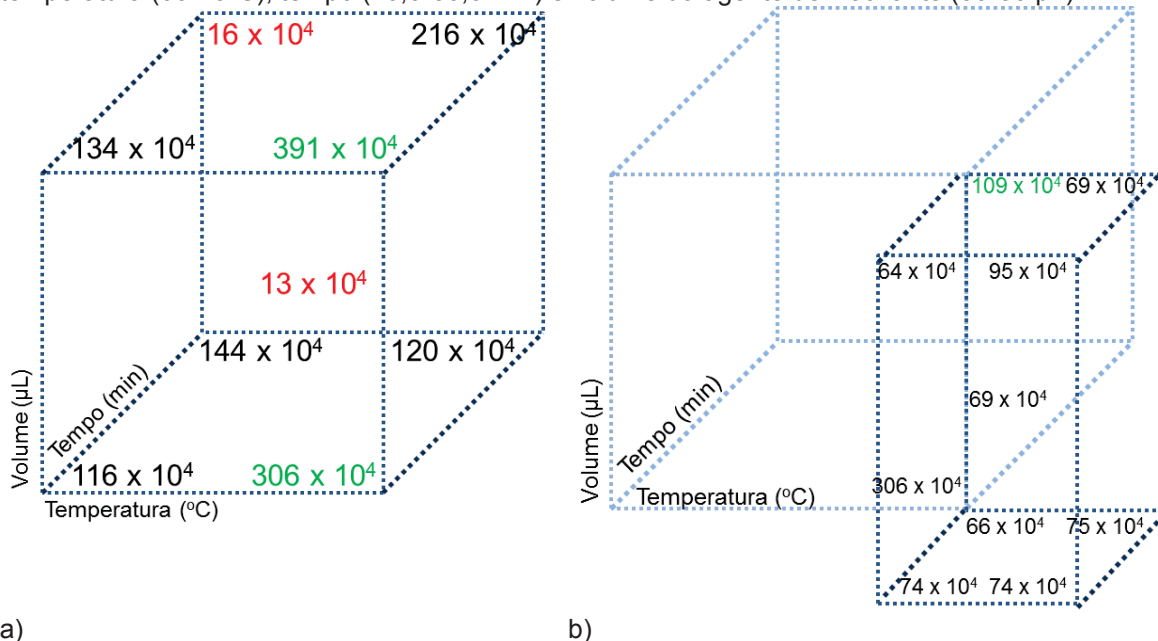
Para os demais parâmetros, foi utilizado o planejamento fatorial com o intuito de obter-se respostas de forma mais rápida e com menor gasto de reagentes derivatizantes, que são de custos extremamente elevados. Inicialmente foi realizado um planejamento fatorial para estudos exploratórios das condições da reação, ou seja, foi necessário averiguar o volume, a temperatura e o tempo ótimo da reação de derivatização. A escolha destes valores foi baseada em valores médios encontrados na literatura (Arroyo *et al* (2007), Azzouz; Ballesteros (2012), Basheer *et al* (2005a), Becker (2012), Dallegrave (2012), Quintana *et al* (2004) e Zhou *et al* (2007)).

O estudo estatístico que contemplou essa etapa do trabalho foi o planejamento fatorial 2^3 , que abrangeu um número de experimento igual a 8 – ver TABELA 15, contendo os níveis das variáveis do planejamento fatorial – essas análises foram realizadas em duplicada com a inclusão de uma triplicata do ponto central, portanto, 19 corridas cromatográficas foram realizadas, com o intuito de observar, preliminarmente, os desvios das medidas. Analisando esse pequeno universo, ou seja, a área do pico de cada analito presente no mix em cada um dos cromatogramas, pode-se fazer uma média desses resultados e gerar um número qualitativo referente a cada experimento, referente aos vértices da FIGURA 14. Os resultados do fatorial 2^3 estão expressos na FIGURA 14a, que apresenta os valores obtidos e visualmente posicionados de modo a formar o primeiro universo de estudo.

TABELA 15: Níveis codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^3 para otimização da reação de derivatização.

	nível -	ponto central	nível +
Temperatura da derivatização (°C)	40	50	60
Tempo de derivatização (min)	30,0	45,0	60,0
Volume do derivatizante (uL)	30	40	50

FIGURA 14: a) Planejamento fatorial 2^3 , onde variou-se a temperatura (40-60°C), tempo (30,0-60,0 min) e volume do agente derivatizante (30-50 μL); b) Planejamento fatorial 2^3 , onde variou-se a temperatura (60-70°C), tempo (20,0-30,0 min) e volume do agente derivatizante (30-50 μL).



Através dos resultados, constatou-se que a elevação da temperatura da reação de derivatização apresentou elevada significância frente às demais variáveis, pois apresentou maior média de área de pico para os analitos investigados. Também constatou-se valores diferentes para mesmas duplas de variáveis, como temperatura x volume, por exemplo (134×10^4 e 391×10^4), pode-se constatar que existem efeitos de segunda ordem associados aos resultados. Os experimentos que geraram a melhor média dos resultados foram os de temperatura de 60°C (nível (+)), volume do derivatizante MSTFA:TMSI 50 μL (nível (+)) e tempo de reação de 30,0 min (nível (-)), representados em verde na FIGURA 14a.

Para garantir que a condição da reação selecionada abrangesse os melhores parâmetros de análise fez-se uma expansão do universo na região de interesse. Portanto, fez-se um segundo planejamento fatorial 2^3 , apresentado como TABELA 16, contendo os níveis das variáveis do segundo planejamento fatorial.

TABELA 16: Níveis codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^3 para otimização da reação de derivatização.

	nível -	ponto central	nível +
Temperatura da derivatização (°C)	60	65	70
Tempo de derivatização (min)	20,0	25,0	30,0
Volume do derivatizante (uL)	30	40	50

Com esses parâmetros conseguiu-se observar outra parte do universo de estudo, que está ilustrado na FIGURA 14b. No segundo cubo obtiveram-se valores de magnitude

semelhante aos pontos do primeiro cubo, incluindo a presença dos efeitos de segunda ordem. Dessa maneira, ao observar os resultados, encontra-se uma reação de derivatização que expressa a condição de compromisso do estudo como sendo a referente ao ponto de 60°C, 30,0 min e 50 µL, sendo este o selecionado para a continuidade do trabalho.

5.2 OTIMIZAÇÃO DAS ENERGIAS DE COLISÕES PARA O MODO MRM

Ao se iniciar os testes para o estudo do modo MRM, primeiramente, deve-se fazer uma corrida cromatográfica no modo *full scan*. Com os resultados dos tempos de retenções devidamente conhecidos pode-se selecionar os íons precursores (geralmente os íons moleculares), que foram utilizados como íons de quantificação dos analitos em análises pelo modo SIM. Na maioria dos casos o íon selecionado foi o de maior intensidade, o qual espera-se acarretar em uma maior detectabilidade no momento da dissociação induzida por colisão com o gás argônio. Dando continuidade a análise, outros dois íons foram selecionados como sendo os íons de confirmação, sendo o segundo e terceiro em ordem de intensidade.

A otimização das energias de colisões foi realizada de modo que todos os analitos pudessem ter energias distintas, se necessário, sempre em busca de uma energia de transição íon precursor > íon produto que gerasse um pico cromatográfico de alta intensidade, ou seja, íons produtos com intensidade consideravelmente superiores às intensidades dos íons precursores. Desta maneira foram avaliadas 3 transições entre íon precursor (ou íon pai) e íon produto (ou íon filho), sendo uma utilizada para as análises quantitativas (aquela de maior estabilidade e intensidade) e outras duas para fins qualitativos. Desse modo, o estudo procedeu de modo exploratório, variando as energias de colisão entre 3 a 51 V, com incrementos de 3 V. Pode-se observar nas FIGURA 15 e FIGURA 16 uma compilação de todos os gráficos gerados automaticamente pelo *software* Excel das energias de colisões de cada analito.

Pode-se visualizar nas FIGURA 15 e FIGURA 16 que os gráficos apresentam 3 gaussianas, a linha em azul representa os dados referentes a otimização das energias de colisão para a transição de maior intensidade, aquela utilizada, portanto, para as análises quantitativas, as quais esperava-se acarretarem em uma maior detectabilidade no momento da dissociação induzida por colisão com o gás argônio no segundo quadrupolo (célula de colisão). O formato gaussiano dos gráficos demonstra de forma inequívoca as energias ótimas de colisão para cada um dos analitos deste trabalho. As linhas em vermelho e em verde são representativas da otimização das energias de colisão para as transições de confirmação, que auxiliam nas análises qualitativas do método proposto.

Na TABELA 13, tem-se um resumo para a melhor compreensão dos dados. A primeira energia de colisão, em negrito, apresentada para cada analito foi a selecionada pelo método MRM e a que será empregada no método de quantificação das futuras amostras.

FIGURA 15: Resposta para cada transição MRM em função da energia de colisão empregada para os compostos TES, EE2, PRO, E3, IBU e PTM. No eixo x tem-se a energia de colisão (V), no eixo y tem-se a intensidade.

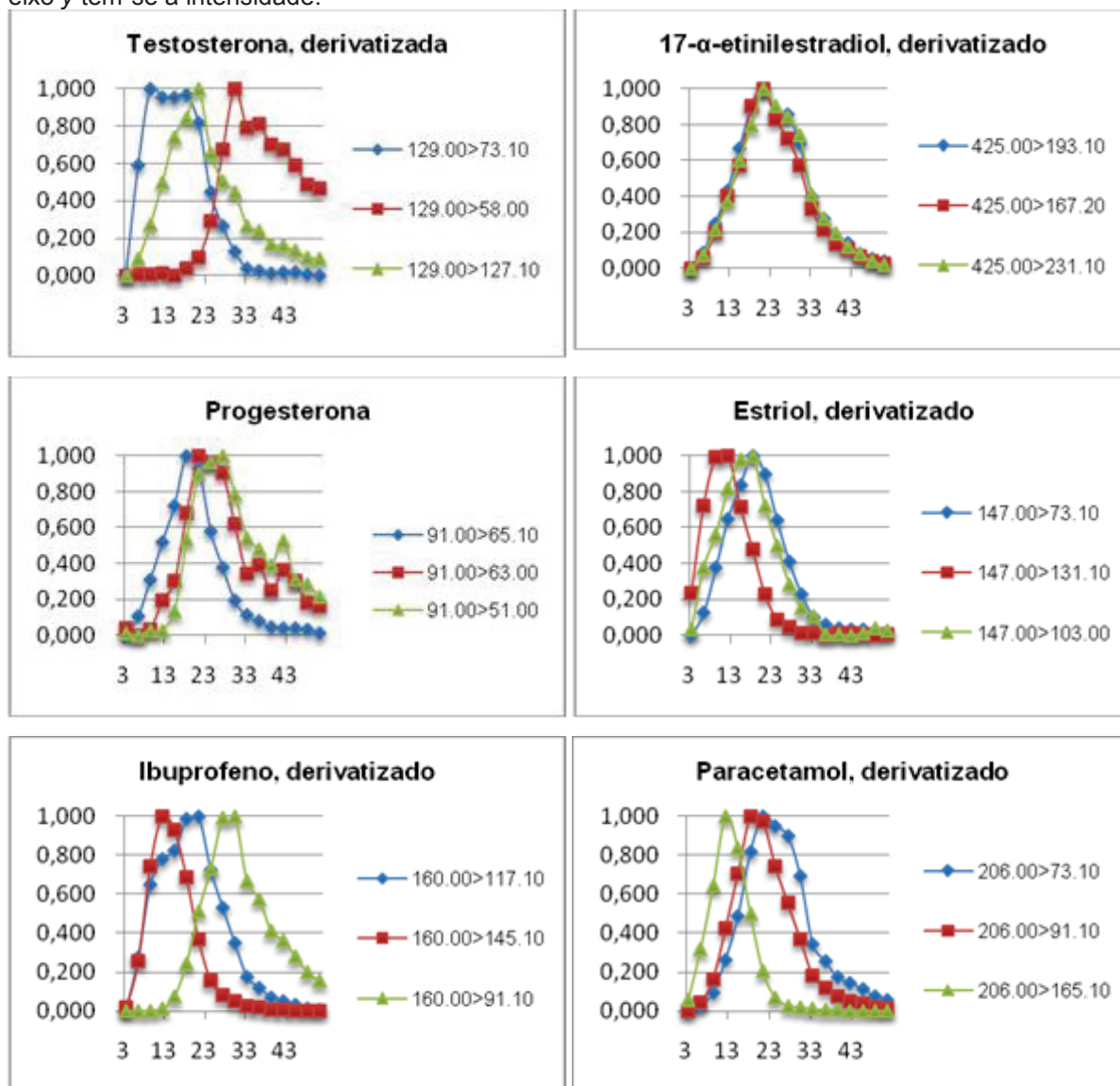
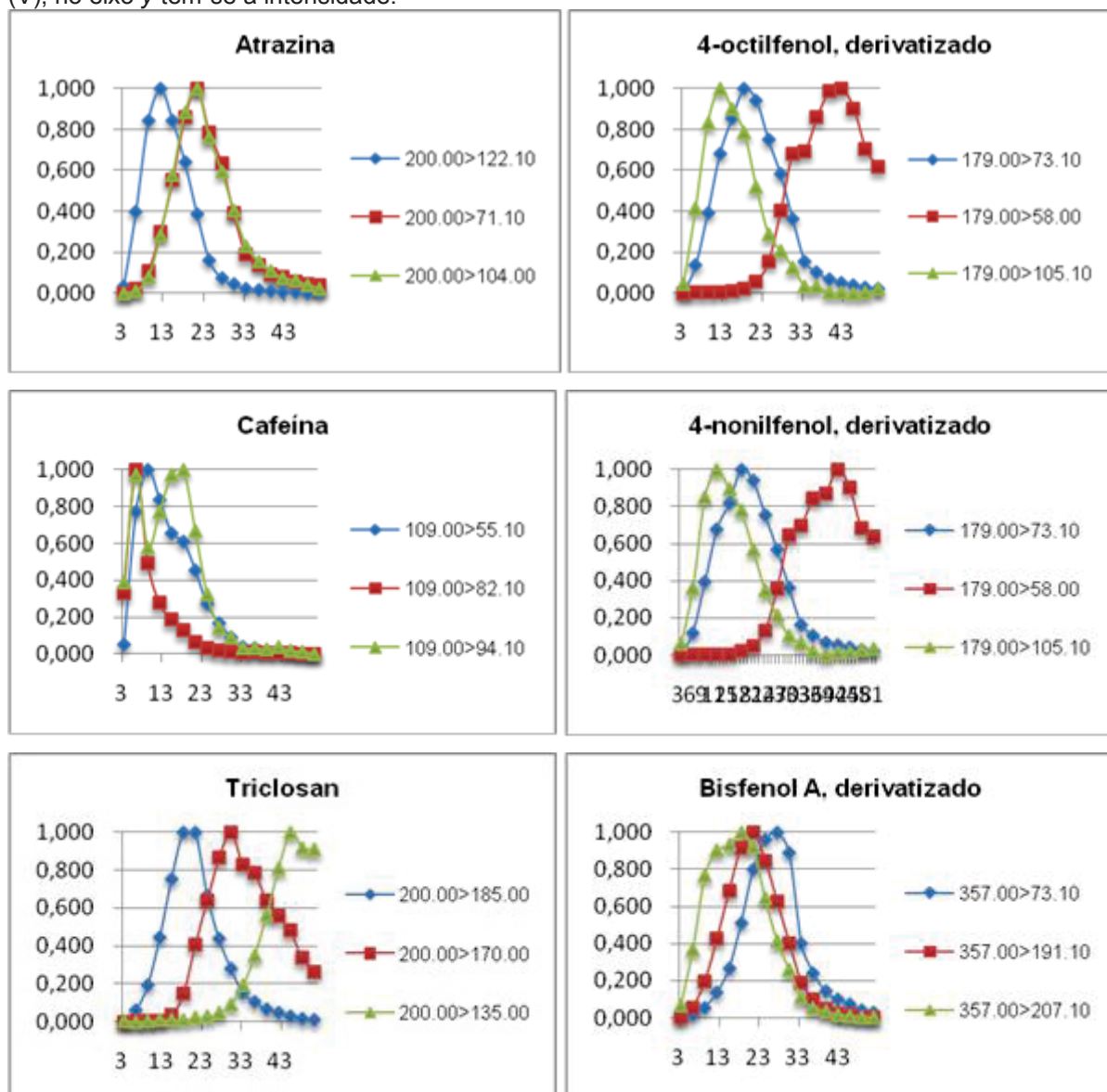
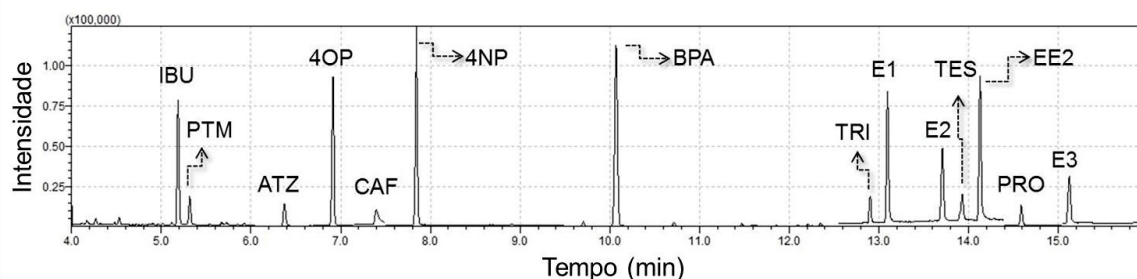


FIGURA 16: Resposta para cada transição MRM em função da energia de colisão empregada para os compostos ATZ, 4OP, CAF, 4NP, BPA, E1 e E2. No eixo x tem-se a energia de colisão (V), no eixo y tem-se a intensidade.



A FIGURA 17 é referente a um cromatograma gerado no modo MRM, com energia de colisão conhecida, 21 V, e serve para exemplificar o comportamento cromatográfico dos analitos em um modo mais seletivo. Cada analito tem um comportamento diferente em cada energia de colisão, sendo que, ao operar o equipamento pode-se utilizar energias distintas em uma mesma corrida cromatográfica.

FIGURA 17: Cromatograma no modo de MRM para a energia de colisão (CE) 21V, em apenas 16 minutos. Sendo os analitos em ordem crescente de tempo de retenção: ibuprofeno (IBU), paracetamol (PTM), atrazina (ATZ), 4-octilfenol (4OP), cafeína (CAF), 4-nonilfenol (4NP), bisfenol A (BPA), triclosan (TRI), estrona, (E1), β -estradiol (E2), testosterona (TES), 17- α -etinilestradiol (EE2), progesterona (PRO) e estriol (E3).



Dessa maneira, com as energias de colisões selecionadas para cada composto de interesse deu-se prosseguimento ao trabalho com a próxima etapa, em que a síntese e avaliação dos hidrogéis como fases extratoras para o dispositivo *labmade* SPME foi investigada.

5.3 AVALIAÇÃO DOS HIDROGÉIS COMO FASES EXTRATORAS

Nesta etapa, a eficiência de extração foi avaliada em termos de recuperação associada a cada ensaio, sendo estes realizados e analisados em GC-MS em um mesmo dia. A recuperação de um analito em um ensaio é a resposta do detector obtida a partir de uma quantidade do analito adicionado e extraído da matriz aquosa, em comparação com a resposta do detector obtida para a concentração real do analito adicionado ao solvente e analisado. Assim, a recuperação refere-se à eficiência de extração de um método analítico dentro dos limites da variabilidade (Food and Drug Administration (2001)). Neste estudo, as taxas de recuperação foram avaliadas por análises de amostras aquosas adicionadas de padrões analíticos na concentração de $500,0 \text{ ng mL}^{-1}$.

Com os primeiros ensaios, referentes aos variados tipos de hidrogel, PA, PEG (300 e 4000 g mol^{-1}), AGA, PVA, e ALG, encontrou-se dificuldade na formação dos géis com PEGs e PA. Nestes casos, baixa estabilidade do gel em meio aquoso ou mesmo ineficácia na formação dos mesmos foram evidenciadas. Desta maneira, ensaios com AGA, PVA e ALG foram realizados a fim de elucidar qual dos 3 materiais possuía maior eficiência de extração. Resultados preliminares de extração indicaram a potencialidade do hidrogel de ALG com relação à fase de sorção para os analitos, sendo este selecionado para o prosseguimento do trabalho. Porém, com intuito de inserir caráter anfifílico à fase extratora, buscando-se assim estabilidade física e alta eficiência de extração para diferentes classes de compostos orgânicos, avaliou-se concomitantemente a modificação estrutural do hidrogel de ALG com a adição do material zeína (Z).

Neste etapa foram avaliadas comparativamente diferentes proporções de blendas de hidrogel – alginato 1,0% (m/v), alginato 2,0% (m/v), alginato(1,0%):zeína 99:1 (v/v), alginato(2,0%):zeína 99:1 (v/v), alginato(1,0%):zeína 97:3 (v/v), alginato(2,0%):zeína 97:3 (v/v), alginato(1,0%):zeína 95:5 (v/v) e alginato(2,0%):zeína 95:5 (v/v). Neste estudo, optou-se também por avaliar uma possível interação entre os analitos e a fibra PP sem qualquer adição de hidrogel. Conforme mostrado na FIGURA 18, pode-se observar que o hidrogel de composição alginato(2,0%):zeína 99:1 (v/v) apresentou os melhores resultados para a maioria dos analitos, principalmente para os hormônios, os quais são, reconhecidamente, de difícil extração em meio aquoso (Dallegrave (2012)).

Dessa maneira, uma segunda e terceira batelada de testes foram realizadas somente com os hidrogéis de alginato 2,0% (m/v) e alginato(2,0%):zeína 99:1 (v/v). Novamente, as extrações utilizando a fibra PP sem qualquer modificação com os referidos hidrogéis também foram avaliadas – FIGURA 19. Observou-se que houve melhora significativa na eficiência de extração para a maioria dos analitos ao adicionar-se alginato na superfície da fibra PP, o que suporta os resultados já observados anteriormente e ilustrados na FIGURA 18.

FIGURA 18: Comparação das áreas dos picos para cada analito com os diferentes tipos de hidrogel suportado na fibra PP. Os analitos estão dispostos em ordem crescente de tempo de retenção. PTM, CAF, TES e PRO tiveram seus valores multiplicados por 10 para melhor visualização.

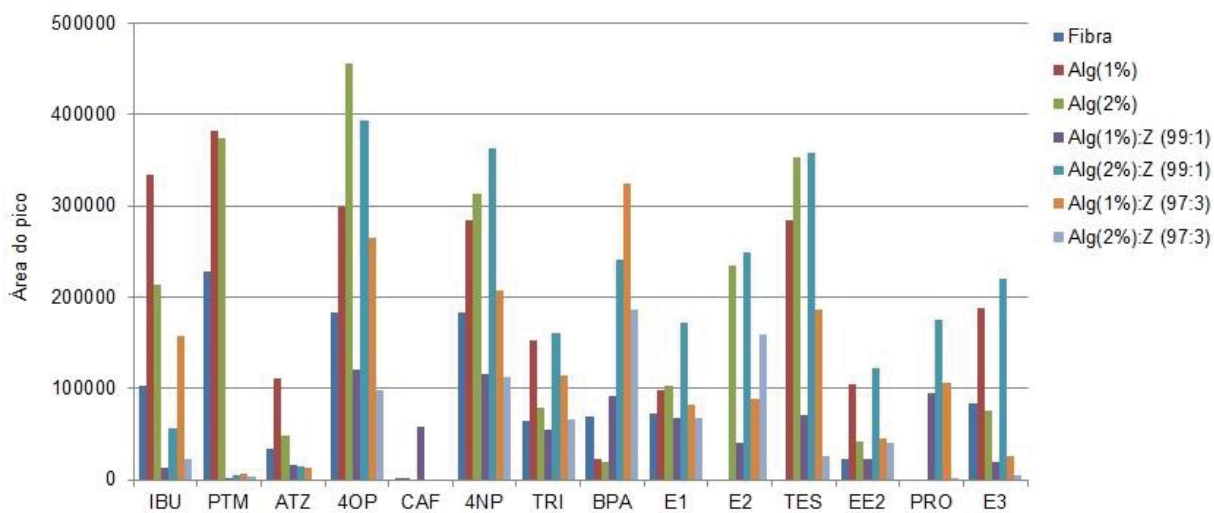
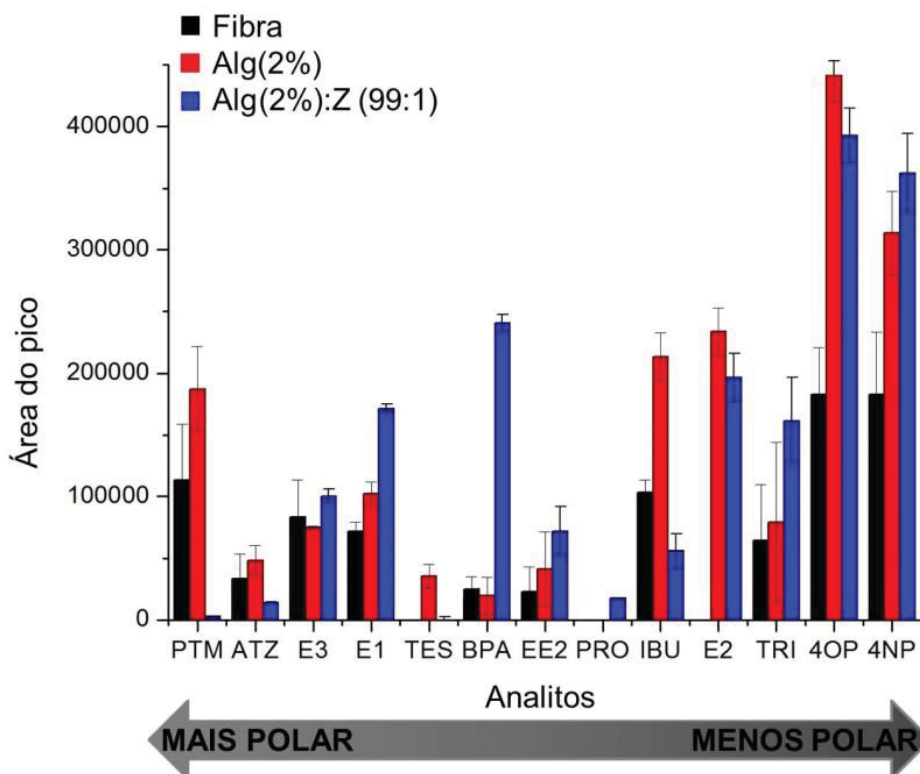


FIGURA 19: Área dos picos após extração de analitos usando fibra PP suportada por hidrogéis na presença e ausência de zeína (n = 3). Os analitos estão dispostos em ordem decrescente de polaridade.



Neste caso, observou-se que a presença do hidrogel de alginato promoveu um aumento significativo na eficiência de extração em especial para os compostos orgânicos com valores de $\log K_{ow}$ baixos, ou seja, para os analitos de caráter mais polar, como é o caso do composto PTM ($\log K_{ow} = 0,46$ (Lardy-Fontan *et al* (2017))). Por outro lado, quando utilizado como fase extratora a blenda de hidrogel alginato(2,0%):zeína (99:1 (v/v)), proporcionou maior eficiência de extração para aqueles compostos de média à baixa polaridade. Este fato é bastante claro quando os resultados são observados para TRI, E1, EE2 e, de forma mais relevante, para PRO. Neste último caso, apenas o hidrogel constituído da blenda foi capaz de extrair de forma quantitativa tal composto.

Para exemplificar, dois compostos com diferentes polaridades serão discutidos comparativamente – PTM e TRI. A eficiência de extração, em termos de taxa de recuperação, ao se utilizar o hidrogel de alginato 2,0% (m/v) foi de 72% para PTM ($\log K_{ow} = 0,46$) enquanto que para o TRI ($\log K_{ow} = 4,76$) foi de 43%. Por outro lado, a eficiência de extração para o TRI foi muito maior quando o hidrogel de alginato(2,0%):zeína (99:1 (v/v)) foi usado. Neste caso, as recuperações para TRI e PTM foram de 89% e 2%, respectivamente.

O aumento da eficiência de extração quando a zeína é adicionada ao hidrogel, para os analitos relativamente menos polares, pode ser explicado pelo fato de que esta

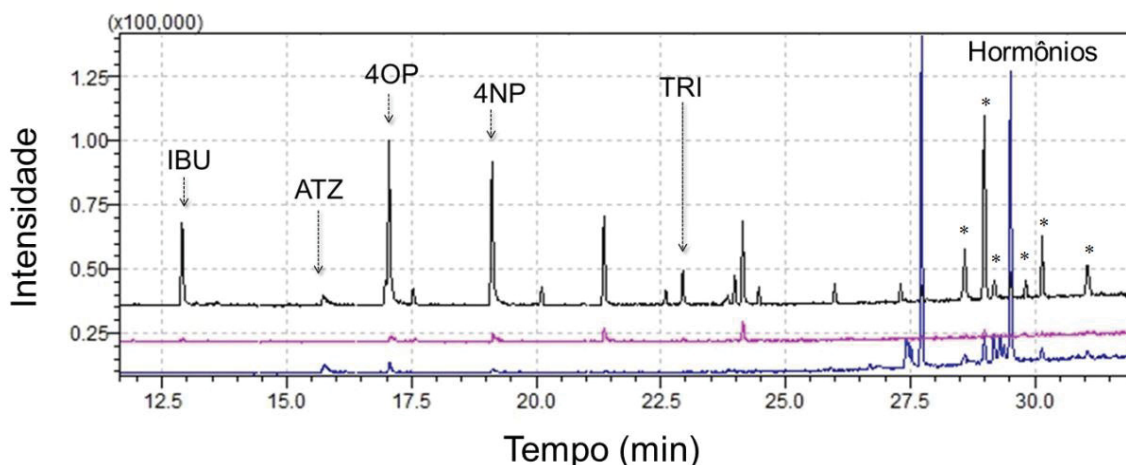
modificação indica a formação de um material com característica hidrofóbica na fase de sorção, que pode ser explicado pela diminuição do intumescimento comparado ao hidrogel constituído somente de alginato (dados apresentados na seção 5.4, referentes à caracterização dos hidrogéis). Acredita-se assim, que uma melhor interação entre os analitos e a fase de sorção através dos grupos funcionais do alginato e da zeína foi alcançada. Esta observação pode ser explicada pela menor quantidade de água dentro da rede tridimensional do hidrogel composto (blenda). Estes resultados mostram que o hidrogel com base na mistura de alginato e zeína poderia ser capaz de extrair compostos polares e de média à baixa polaridade de amostras aquosas, podendo ser usado como uma fase de sorção anfifílica.

Para avaliar não somente a eficiência de extração, mas também uma possível sorção irreversível ou um forte aprisionamento físico do analito no hidrogel, realizou-se uma extração líquido-líquido na fase aquosa remanescente após o procedimento de extração com o hidrogel alginato(2,0%):zeína 99:1 (v/v), o qual será denominado como Alg:Z a partir de agora. De acordo com a FIGURA 20, é possível observar que alguns analitos, especialmente aqueles provenientes da classe dos hormônios, permaneceram quantitativamente na solução (linha azul no cromatograma da FIGURA 20). No entanto, esta aparente baixa eficiência de extração pode ser resolvida variando as proporções de zeína na mistura de modo a diminuir ainda mais a quantidade de água dentro dos canais do hidrogel formado. Além disso, a otimização dos parâmetros de extração/dessorção contribuíram para maiores eficiências de extração, como será discutido posteriormente.

Por outro lado, de acordo com a linha rosa do cromatograma da FIGURA 20, que corresponde à segunda dessorção, é possível notar que apenas uma pequena quantidade de analitos está presente. Este fato prova que o passo de dessorção no processo de extração, usando fibra à base de hidrogel, é eficiente uma vez que o efeito de memória não é evidenciado. De acordo com esses resultados, a reutilização do dispositivo demonstra viabilidade e será avaliado em tópicos seguintes, descrito neste trabalho (sessão 5.5).

Com relação a uma possível interação dos analitos com a própria fibra PP, verificou-se que esta atua, de certa forma, como uma fase de extração, como mostrado nas FIGURA 18, FIGURA 19 e FIGURA 21. Esta observação prova que os grupos metila na estrutura do polipropileno atuam como locais de sorção no processo de extração (linha rosa no cromatograma da FIGURA 21). Portanto, a contribuição desta interação no processo de extração deve ser considerada. No entanto, como mostrado anteriormente e observando a linha preta no cromatograma da FIGURA 21, a adição de hidrogel na superfície da fibra PP aumentou consideravelmente a eficiência da extração, pelo menos para os analitos deste estudo.

FIGURA 20: Superposição de cromatogramas em modo SIM que representam a extração de analitos ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Utilizando Alg:Z tem-se a primeira dessorção em preto, a segunda dessorção do mesmo dispositivo em rosa e após extração líquido-líquido da fase aquosa residual em azul. Os asteriscos são referentes aos hormônios E1, E2, TES, EE2, PRO e E3, respectivamente.



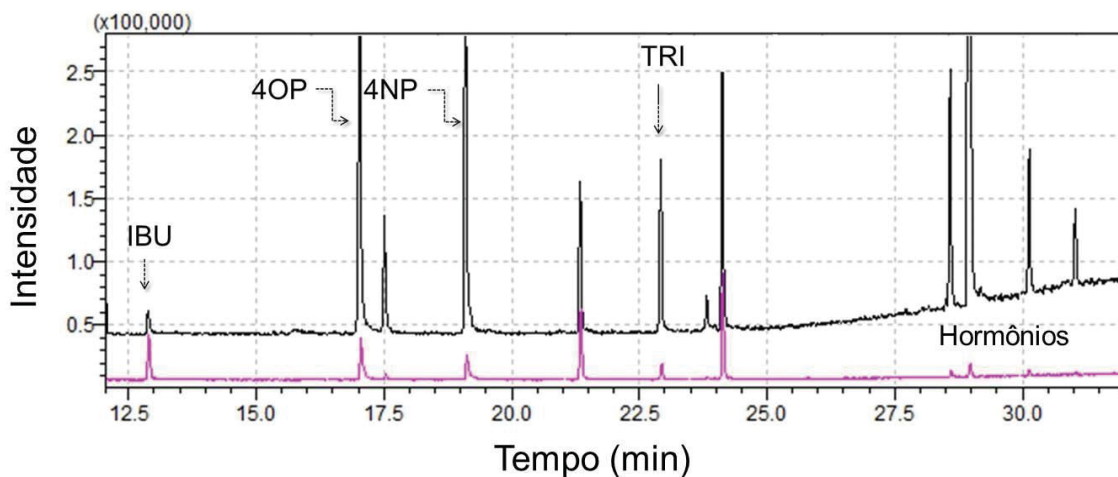
Pouco se sabe sobre a extração usando fibra PP sem modificação. Basheer e colaboradores (2004, 2005a) usaram a mesma fibra para suportar o polímero polimetilmetacrilato dihidroxilado (DHPMM) com intuito de aplicar o dispositivo na extração de hormônios em amostras aquosas. Os autores obtiveram êxito em seus resultados, mas não os compararam com a possibilidade da fibra PP atuar como uma fase de extração ou até mesmo ser a única responsável pela extração. No entanto, é bastante claro que, a exemplo, neste estudo, apenas a fibra PP não foi capaz de extrair os compostos PRO e TES (FIGURA 19 e FIGURA 21). Mesmo considerando a baixa resposta desses analitos no sistema GC-MS (baixa intensidade de pico), a interação entre o analito e o hidrogel, isto é, Alg-TES ou Alg:Z-PRO possibilitou a extração dos mesmos.

Embora outros pesquisadores (Müller *et al* (2003), Montes *et al* (2008)) já tenham sugerido que a fibra PP pode contribuir para a extração de compostos com alto valor de K_{ow} de amostras aquosas, esta possibilidade ainda não foi explorada na literatura mais a fundo.

Com relação aos dispositivos comerciais de SPME, vários trabalhos na literatura relataram o uso de diferentes fases extratoras para obtenção de alguns dos compostos de interesse avaliados neste estudo, como por exemplo, a ATZ (Tomkins; Ilgner (2002)), E1, E3, EE2 (Quintana *et al* (2004)) e BPA (Hu *et al* (2006)). Nestes casos, foram utilizadas fases de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), poliácrlato (PA), carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) e carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB) para determinação de tais compostos em matrizes aquosas. Boa eficiência de extração (recuperações até 79%) foi relatada, no entanto, a cinética da extração foi muito baixa,

especialmente para EE2, com tempos de equilíbrio acima de 2,0 h (Quintana *et al* (2004)). Além disso, como se sabe, as fibras comerciais são, geralmente, de alto custo e a grande parte das fibras em fase sólida *labmade* não geram resultados reprodutíveis (Xu *et al* (2014)).

FIGURA 21: Superposição de cromatogramas em modo SIM que representam a extração de analitos ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Utilizando hidrogel de Alg:Z tem-se a primeira dessorção em preto, e utilizando apenas a fibra PP, em rosa.



Em suma, a partir dos testes realizados até então, foi comprovado que o uso do dispositivo utilizando o hidrogel de alginato(2,0%):zeína 99:1 (v/v) foi capaz de extrair compostos orgânicos com diferentes polaridades. Para uma melhora de eficiência de extração e dessorção dos analitos, estudos de otimização foram conduzidos e serão apresentados a seguir.

5.4 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO E DE DESSORÇÃO

Com o objetivo de alcançar melhores condições de visualizações cromatográficas estudou-se a otimização da etapa de extração e dessorção dos analitos em que realizaram-se experimentos multivariados com o intuito de diminuir consideravelmente o número de ensaios necessários para se avaliar as variáveis através de planejamentos composto central (CCD). Foram levados em consideração os parâmetros pH da amostra, força iônica da amostra, temperatura de extração e tempo de extração, além do tempo de dessorção. Neste primeiro momento, de acordo com a TABELA 5, que quantifica os níveis das variáveis dos ensaios, e a TABELA 6, que é o delineamento propriamente dito – com o auxílio do planejamento Plackett-Burman, foram exploradas grandes faixas dentro de cada variável a fim de se encontrar uma área de estudo próxima da região ótima de interesse.

Neste caso, 12 experimentos foram conduzidos com a soma de 5 experimentos centrais, como observa-se na primeira coluna da TABELA 6. De acordo com a literatura, deve-se realizar alguns ensaios do ponto central para verificar a existência ou não de uma curvatura nesta região (Rodrigues e lemma (2014)). Os pontos centrais também são utilizados para fazer referência a estimativa do erro puro, sendo possível avaliar a repetibilidade do processo.

As matrizes, para cada analito, são montadas de forma que há sempre um deslocamento da linha seguinte à medida que passa de uma coluna para outra; na TABELA 6 a linha referente ao conjunto de sinais principais está destacada em negrito. A matriz final obtida é uma matriz ortogonal, sendo que o conjunto de sinais da diagonal superior é o espelho da diagonal inferior. Na última linha é acrescentado o sinal de -1 para todas as colunas. Este esquema é o mesmo para todas as matrizes Plackett-Burman (Rodrigues, M. I.; lemma (2014)).

A diferença entre o número de colunas da matriz e o número de fatores que estão sendo testados define o número de colunas denominadas como variáveis inertes (VI), nesse caso específico 6. Elas não são colunas que devem ser levadas em desconsideração, pois serão utilizadas para o cálculo do resíduo.

Muitas vezes é possível concluir-se que, antes de estimarmos os efeitos dos fatores, é preciso verificar ponto a ponto todas as etapas do processo para minimizar os erros, visualizar se não existem discrepâncias entre as amostras. Isto possibilita a diminuição da variabilidade das respostas levando a um controle mais adequado do processo. Com os resultados dos experimentos centrais foram realizados testes Q (Teófilo, Reinaldo; Ferreira (2006)), sendo na estatística, uma forma de comparação entre amostras que visa estabelecer a existência de diferença significativa entre elas, com o objetivo de se identificar amostras anômalas. Nesta etapa, as respostas para os analitos consideradas anômalas foram descartadas do planejamento. Com os valores de área do pico foram calculados a média e o desvio padrão para cada analito referente ao ponto central ($n = 5$), tem-se como exemplo a ATZ (TABELA 17). Neste caso a “Resposta” refere-se ao valor encontrado para o desvio padrão multiplicado pelo valor de teste t referente ao experimento.

TABELA 17: Dados dos pontos centrais obtidos para a atrazina.

Média das Áreas de Picos	987
Desvio Padrão	116,70
Desvio Padrão (%)	11,85
$t_{(90;4)}$	2,13
Resposta	248,59

Pôde-se continuar os próximos delineamentos visando à otimização. O passo seguinte da análise dos resultados foi o de observar os efeitos de cada uma das variáveis para cada analito separadamente. A seguir apresenta-se a TABELA 18, referente à ATZ, exemplificando os cálculos que foram feitos com cada analito seguindo explicações da literatura (Rodrigues e lemma (2014)), sendo o valor puro do efeito (sem sinal) considerado significativo, se este for superior ao valor da “Resposta”, localizado na TABELA 17. Para a ATZ todas as variáveis foram consideradas significativas. O sinal de cada efeito tem o significado de explicar para qual sentido “caminha” o efeito, se para o eixo positivo ou para o eixo negativo. Os cálculos para os demais analitos encontram-se no APÊNDICE A.

Os cálculos dos efeitos principais e do erro padrão para as matrizes de Plackett-Burman podem ser realizados por um *software* de estatística, planilhas de cálculos ou mesmo no “lápiz” e calculadora. Para demonstrar o procedimento de cálculo que foi empregado na TABELA 18 seguiu-se os determinador passos.

TABELA 18: Valores de área do pico e estudo dos efeitos das variáveis pH de extração, força iônica, tempo de extração (t_{ext}), temperatura de extração (T_{ext}) e tempo de dessorção (t_{dess}) para atrazina.

		pH _{ext}	F iônica	t _{ext}	T _{ext}	t _{dess}	Área do pico
1	1	1	-1	1	-1	-1	182
2	1	1	1	-1	1	-1	3147
3	1	-1	1	1	-1	1	981
4	1	1	-1	1	1	-1	820
5	1	1	1	-1	1	1	2635
6	1	1	1	1	-1	1	2236
7	1	-1	1	1	1	-1	7586
8	1	-1	-1	1	1	1	1741
9	1	-1	-1	-1	1	1	3606
10	1	1	-1	-1	-1	1	1102
11	1	-1	1	-1	-1	-1	9233
12	1	-1	-1	-1	-1	-1	1596
13	1	0	0	0	0	0	878
14	1	0	0	0	0	0	1146
15	1	0	0	0	0	0	927
16	1	0	0	0	0	0	997
17	1	0	0	0	0	0	143
Soma (+)		38956	10122	25818	13546	19535	12301
Soma (-)		0	24743	9047	21319	15330	22564
Total soma		38956	34865	34865	34865	34865	34865
Diferença		38956	-14621	16771	-7773	4205	-10263
Efeito		3246	-2436	2795	-1295	700	-1710

pH_{ext} (4,0, 6,0 e 8,0); F iônica (0,5, 1,25 e 3,0 %); t_{ext} (30,0, 45,0 e 60,0 min); T_{ext} (30, 40 e 50°C) e t_{dess} (60, 90 e 120 min).

O procedimento geral para o cálculo dos efeitos e erro padrão dos planejamentos Plackett-Burman consiste em primeiramente acrescentar uma coluna com sinal positivo em todos os ensaios (denominada também de coluna identidade) antes da coluna da variável X1 para a determinação da média global.

Seguidamente, acrescenta-se linhas ao final do planejamento para os seguintes cálculos:

- Soma (+): somar todas as respostas que estejam associadas ao sinal (+);
- Soma (-): somar todas as respostas que estejam associadas ao sinal (-);
- Checar a soma: somar os valores positivos e negativos. Os valores obtidos nesta linha deverão ser iguais à soma de todas as respostas obtidas;
- Calcular a diferença existente entre Soma (+) e Soma (-);
- Calcular os efeitos das variáveis: diferença dividida pelo número de ensaios na condição – ou +;
- Calcular o valor de $t = \text{efeito/erro padrão}$;
- Determinar o valor de p na tabela de distribuição de t para determinar o nível de significância.

Sendo o cálculo do erro padrão seguindo a seguinte EQUAÇÃO 3 (Rodrigues e lemma (2014):

$$Ep = \left[\frac{1}{q} \sum (ef \ VI)^2 \right]^{1/2}$$

EQUAÇÃO 3

no qual: VI denota as variáveis inertes, isto é, as colunas que restam após as utilizadas pelas variáveis em estudo. Elas são utilizadas matematicamente para o cálculo de erro padrão; q é o número de variáveis inertes.

Levando-se em consideração todos os resultados gerados, para a maioria dos analitos, as variáveis força iônica da amostra, tempo de dessorção e temperatura de extração foram as mais significativas, com isso, um segundo estudo foi realizado para explorar de um modo mais preciso essas 3 variáveis.

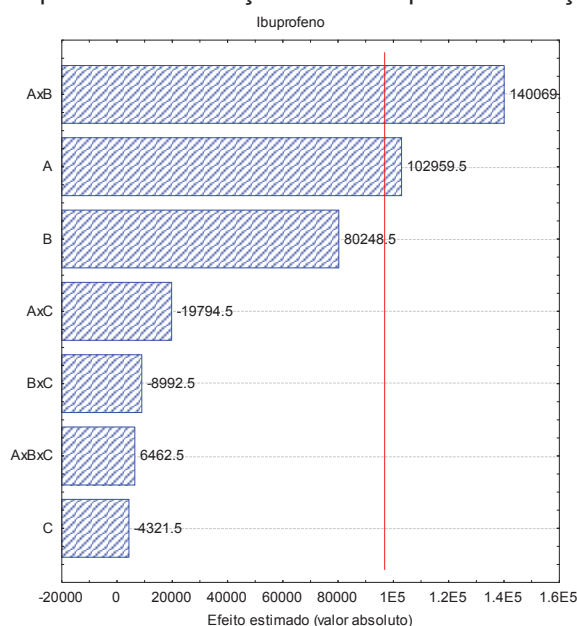
O fator pH não teve influência na eficiência da extração, pelo menos na faixa avaliada (pH 4,0; 6,0 e 8,0). Neste caso, nota-se que a maioria dos analitos apresenta valores de constante de acidez (em termos de pKa) maiores que 10 (Farmacopéia do Brasil (2010)), portanto, encontram-se não dissociados no intervalo de pH estudado, de 4,0 a 8,0. Dessa forma, escolheu-se proceder com a extração dos analitos em pH 6,0, pela proximidade do pH da matriz aquosa, ou seja, não foi necessário ajustar o pH nas extrações seguintes. Com relação ao tempo de extração, dentre aqueles avaliados (30,0, 45,0 e 60,0 min), 30,0 min foi o selecionado, por garantir satisfatória eficiência de extração em menor tempo de análise.

Em um segundo momento, realizou-se a otimização utilizando um delineamento fatorial 2^3 com configuração em estrela, como apresentado nas TABELA 9 e TABELA 10. Neste caso, foram exploradas menores faixas dentro de cada variável, a fim de se encontrar uma área de estudo próxima da região ótima de interesse. Para isso, 14 experimentos foram conduzidos com a soma de 5 experimentos centrais.

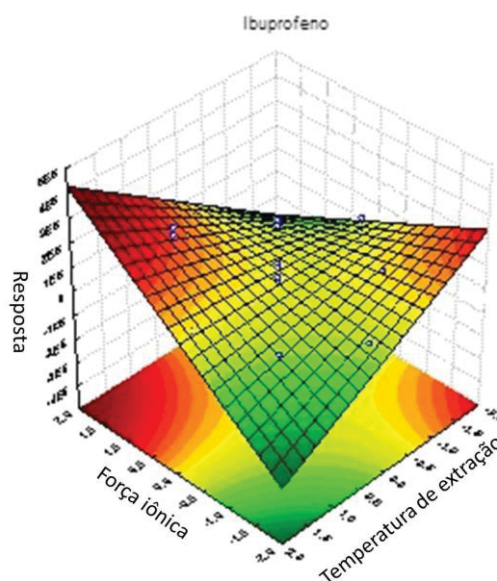
Da mesma forma, foram estudados os pontos centrais com relação a respostas anômalas empregando-se teste Q (Teófilo, Reinaldo; Ferreira (2006)), porém, dessa vez, nenhuma amostra foi descartada. Com os experimentos foram gerados gráficos de Pareto através do programa *Statistica*®, como exemplifica a FIGURA 22a representativa do composto IBU e o APÊNDICE B para os demais analitos.

Os gráficos de Pareto estão representados com os valores absolutos dos efeitos para todos os compostos (APÊNDICE B). Os efeitos, principais e de interação, significativos foram aqueles que apresentaram valores superiores à estimativa do desvio do efeito associada ao valor de t de Student ($t_{95\%} = 2,132$; $v = 4$), a qual é representada nos gráficos pela linha vermelha. Foi observado que somente o IBU apresentou efeitos significativos, sendo estes: força iônica e força iônica x temperatura de extração. Tanto o aumento da força iônica quanto da temperatura de extração proporcionaram um ganho na intensidade do pico, porém o primeiro acarreta a uma resposta consideravelmente maior.

FIGURA 22: a) Gráfico de Pareto e b) superfície de resposta para o composto ibuprofeno obtido no delineamento fatorial 2^3 com configuração em estrela. Sendo A a variável – força iônica, B – temperatura de extração e C – tempo de dessorção.



a)

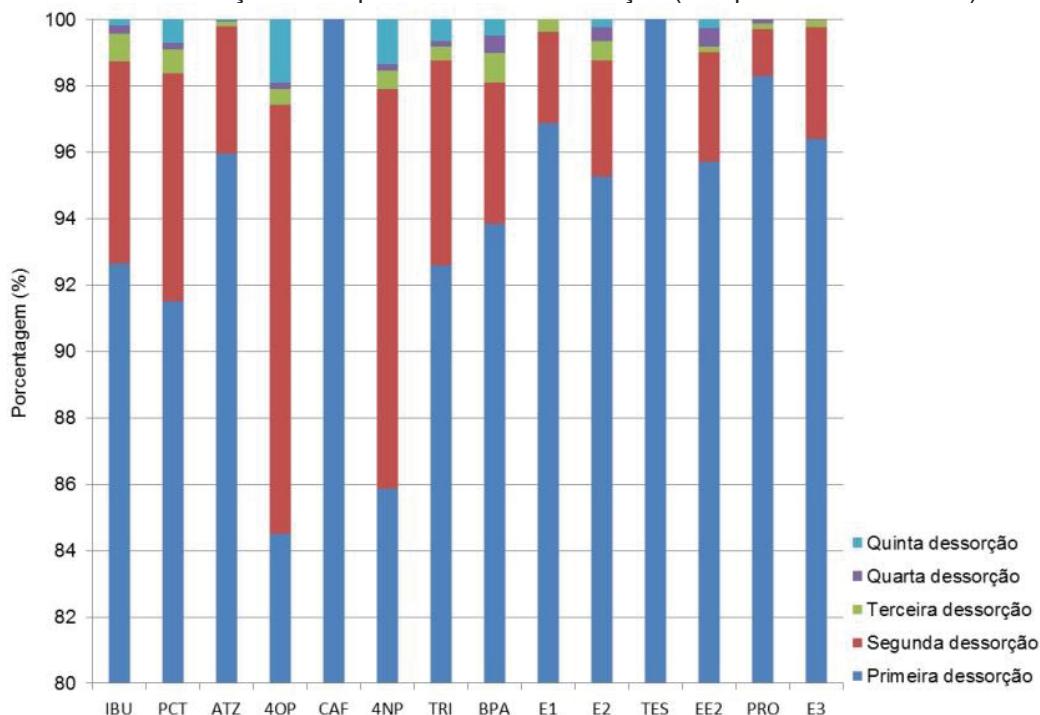


b)

Para a construção de gráficos de superfície de resposta é necessário se observar a tabela de análise de variância (ANOVA) gerada para cada composto. Com os dados, constatou-se que todos os compostos, exceto IBU, apresentam falta de ajuste em todos os modelos gerados, ou seja, somente foi possível a construção do gráfico de superfície de resposta para este composto, observado na FIGURA 22b. Este tipo de gráfico é útil para fins de compreensão sobre região ótima de eficiência de extração. A falta de ajuste encontrada nos demais compostos não é um aspecto negativo, já que somente exprime um dado que condiz com a situação matemática do experimento, refletindo dessa forma, que não houve nenhum modelo capaz de representar através de funções matemáticas o que ocorreu experimentalmente. Para contornar a falta de ajuste poderia-se utilizar um valor de t de Student com uma porcentagem de significância menor, como 90 ou 80%.

Por fim, a quantidade de ciclos de dessorções foi avaliada. Como observa-se na FIGURA 23, para se atingir ao menos 95% de eficiência de dessorção, 2 etapas, de 190 μ L de metanol cada, foram necessárias. Este parâmetro possui importância especial na avaliação do dispositivo proposto, já que se vislumbra a possibilidade de reutilização do mesmo em extrações sequenciais. Desta forma, o efeito de memória ou etapa de dessorção mal procedida poderia acarretar em interferência durante extrações sequenciais, utilizando-se uma única fase extratora. Maiores volumes de metanol, ou uma terceira etapa de dessorção, não foram consideradas por não acarretarem em acréscimo significativo na eficiência de dessorção, ao mesmo tempo que, para este trabalho, o uso de um menor volume de solventes orgânicos foi levado em consideração.

FIGURA 23: Avaliação da etapa de ciclos de dessorção (190 μ L de metanol cada).



5.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS HIDROGÉIS

Como descrito no tópico de metodologia, os hidrogéis baseados em alginato 2,0% (m/v) (Alg) e alginato(2,0%):zeína 99:1 (v/v) (Alg:Z) foram caracterizados de acordo com os seguintes parâmetros: grau de intumescimento, perda de água, espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de varredura.

O comportamento da estabilidade dos hidrogéis Alg e Alg:Z foi primeiro avaliado em diferentes valores de pH, sendo estes 4,0, 7,0 e 9,0. Verificou-se que o material, quando exposto à solução aquosa de pH 9,0, perde completamente sua integridade física, o que pode ser atribuído pelo deslocamento dos íons de cálcio da rede polimérica, causando a desestabilização e por consequência a quebra da rede tridimensional de hidrogel. Este comportamento é intrínseco de hidrogéis de alginato e outros polímeros aniônicos (Cavallaro *et al* (2013)). Em valores de pH 4,0 e 7,0, o hidrogel se manteve íntegro, o que propiciou a possibilidade do uso de soluções aquosas em pH 6,0 para o processo de extração, como apresentado anteriormente na seção de otimização dos parâmetros de extração.

O processo termogravimético, referente às substâncias alginato, zeína e da blenda Alg:Z, foi analisado comparativamente na FIGURA 24. A curva dTG do Alg mostrou 2 eventos de perda de massa associados, respectivamente, à perda de água adsorvida (até 150°C) e à degradação das cadeias de alginato (de 200 a 300°C). A degradação da zeína ocorreu em um intervalo de temperatura maior (de 200 a 370°C). O hidrogel Alg:Z exibiu um perfil que pode ser interpretado como uma combinação dos perfis de alginato e zeína, exceto pelo fato de que a perda de água sorvida no hidrogel foi menos intensa. A ligeira mudança observada nas temperaturas mais baixas pode ser atribuída à preparação da amostra, uma vez que a área da superfície da blenda foi referente a pequenas esferas, e assim, permitiu-se uma melhor transferência de calor comparado ao alginato, que foi usado diretamente na sua forma adquirida comercialmente, na forma de pó. Ainda sobre a FIGURA 24, não foi observado nenhum pico adicional na curva da blenda de hidrogel, o que indica a presença de alginato e zeína de forma inequívoca ao material desenvolvido.

A permeação do azul de metileno, um corante polar, através de ambos os hidrogéis (Alg:Z e Alg) foi observado experimentalmente. Na FIGURA 25, pode-se notar que a solução de azul de metileno permeou apenas 0,25 cm através do hidrogel de Alg:Z, enquanto que a permeação foi completa (3,0 cm) para o hidrogel de Alg puro. Dessa maneira, pode-se considerar que a adição de zeína ao hidrogel de alginato resultou em uma barreira física para a permeação do azul de metileno. Desta maneira, acredita-se

que a permeação de uma solução através do hidrogel é inversamente proporcional à rigidez da rede de gel, à sua porosidade e hidrofobicidade.

FIGURA 24: Curvas dTG obtidas para o hidrogel de alginato:zeína (Alg:Z), alginato (Alg) e zeína (Z).

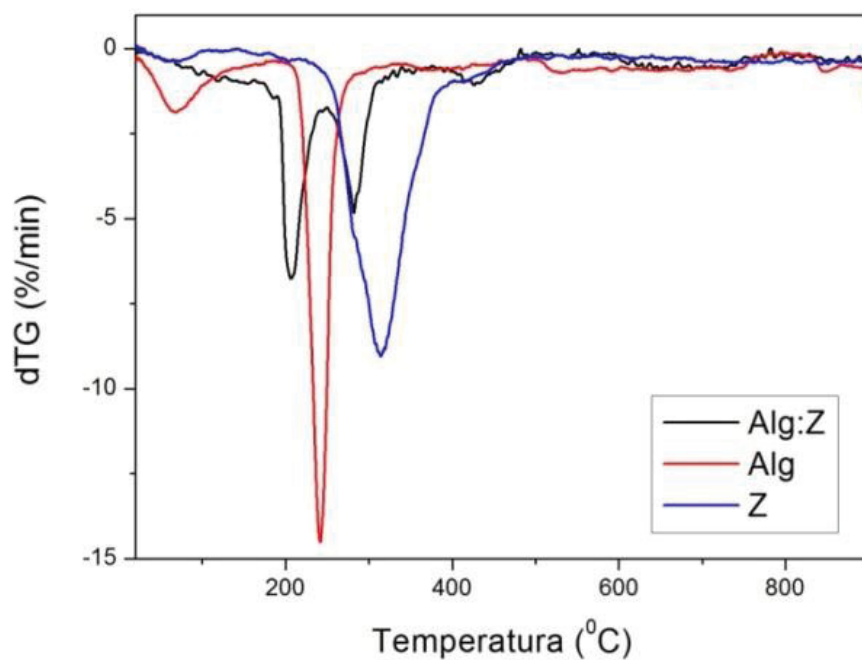
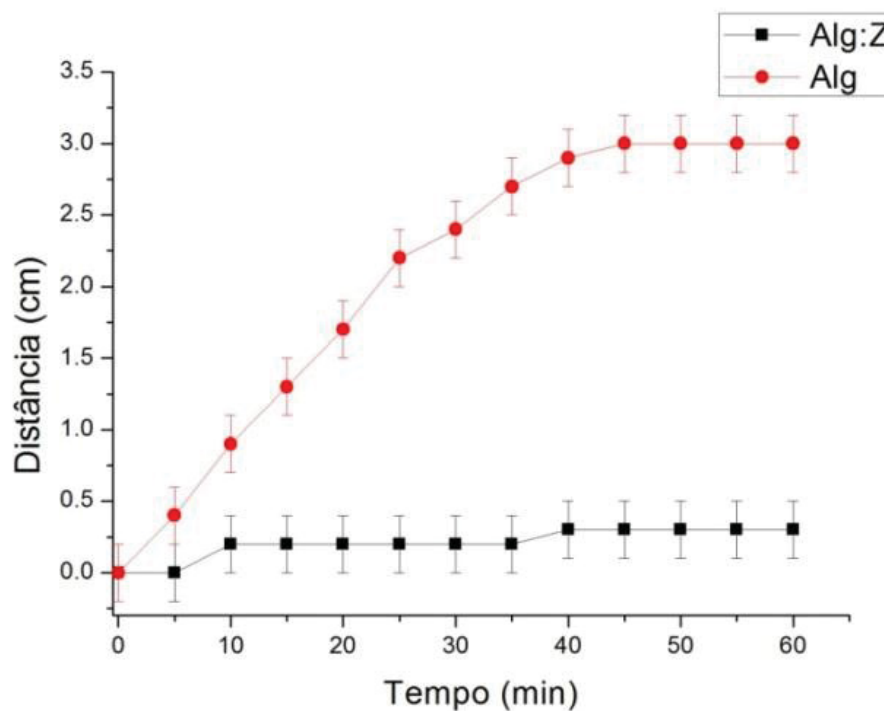
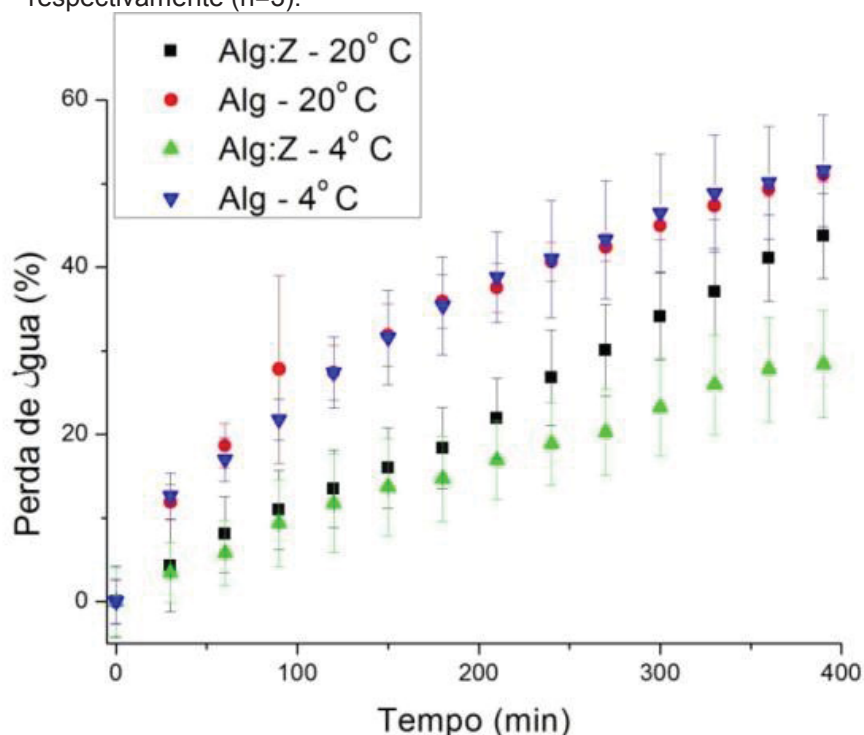


FIGURA 25: Distância percorrida pela solução de azul de metileno através dos hidrogéis Alg e Alg:Z (n = 3).



A sinerese é conhecida como o processo de expulsão de água devido à contração espontânea da rede tridimensional de gel como resultado do estresse térmico (Lopes (2016)). Na FIGURA 26 pode-se notar que quando os hidrogéis foram submetidos a duas temperaturas diferentes, 4 e 20°C, ambos perderam água a uma taxa máxima de 50% em peso. A aparente característica linear das curvas também indica uma taxa de evaporação constante em ambas as temperaturas. Com relação à temperatura, a perda de água, de forma discreta, é mais pronunciada a 20°C. Já no tocante à presença de zeína, em ambas as temperaturas, pode-se concluir que esta dificultou a migração de água para fora da rede de hidrogel. A perda de água foi monitorada experimentalmente até o equilíbrio ser atingido, sendo este alcançado após 72,0 h a 20°C. Para o hidrogel de Alg:Z, observou-se uma massa final do hidrogel 2700 vezes menor do que a massa inicial. No entanto, para o hidrogel constituído somente de Alg, a massa final foi 4550 vezes menor. Os resultados evidenciam a formação de uma rede mais compacta com o hidrogel de Alg:Z, possivelmente porque a zeína atua como agente de reticulação das cadeias de alginato, supostamente através de porções de glutamina presentes nas frações de zeína (Han *et al* (2014)).

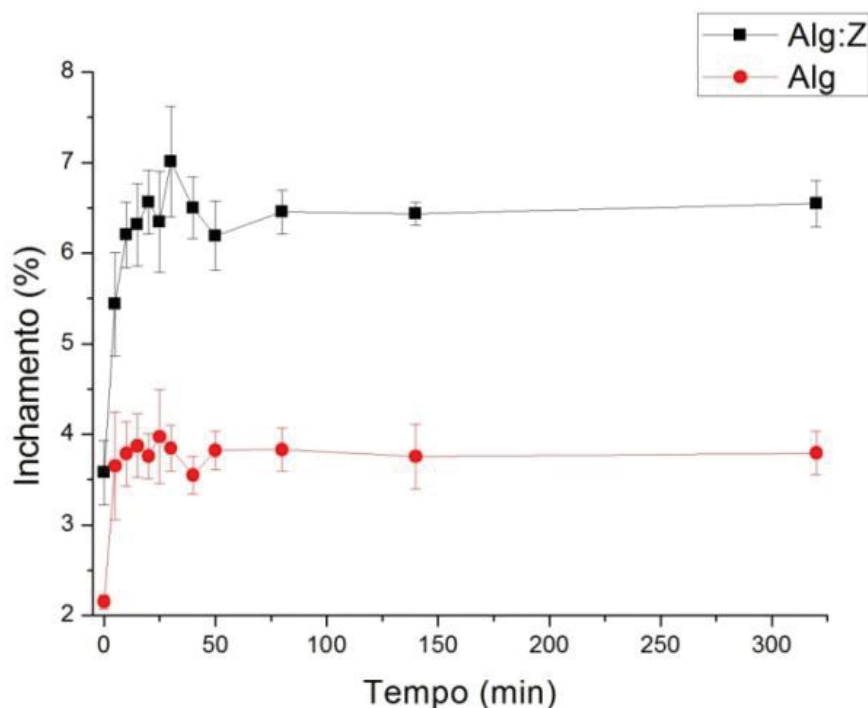
FIGURA 26: Gráfico da perda de água (% com relação ao peso) dos hidrogéis em duas temperaturas diferentes: 20°C (preto e vermelho) e 4°C (azul e verde), respectivamente (n=3).



Outro experimento realizado para a caracterização do material foi o que se refere ao comportamento de inchaço, ou intumescimento, do hidrogel de Alg:Z comparado ao

de Alg – FIGURA 27. Observou-se um aumento na absorção de água para ambos os hidrogéis até atingir-se um estado de equilíbrio. Constatou-se que o teor de água sorvida pelo hidrogel de Alg puro é quase 1,6 vezes menor do que o de Alg:Z (4,0% em peso e 6,5% em peso, respectivamente). Estes valores são muito inferiores aos de perda de água vistos na FIGURA 26, revelando que a perda de água/absorção não é reversível. O processo físico de perda de água e a tentativa subsequente de intumescimento podem ser considerados apenas parcialmente reversíveis, o que caracteriza a formação de um material plástico incapaz de retornar à sua forma original. Entretanto, esta característica não impediu a reutilização do dispositivo para extrações sequenciais com precisão satisfatória e ausência de efeito de memória, como será apresentado no estudo de repetibilidade referente ao reuso da fibra na sessão 5.5.

FIGURA 27: Índice de inchaço (% com relação ao peso) dos hidrogéis Alg:Z e Alg em pH 4 (n = 3).



Correlacionando a quantidade de água presente na rede tridimensional dos hidrogéis com a capacidade de sorção dos analitos, ou seja, a capacidade de interagir com substâncias no interior e na superfície do hidrogel, esperava-se que hidrogéis com quantidades maiores de água pudessem ter uma maior interação com os compostos orgânicos presentes na amostra e, dessa forma, ser um fator limitante na escolha do hidrogel para recobrir a fibra PP. Este evento é extremamente importante quando extrapola-se essa hipótese para os analitos polares, pois as suas solubilidades em água são altas, mas constatou-se que essa hipótese não foi afirmativa, de acordo com os

dados previamente apresentados nas FIGURA 18 e FIGURA 19. Ao comparar a análise cromatográfica dos hidrogéis de Alg e Alg:Z, foi evidente que a eficiência da extração para o Alg (o hidrogel com maior quantidade de água em sua rede) foi menor. Desta maneira, constatou-se que uma melhor interação entre os analitos e a fase de sorção através dos grupos funcionais do alginato e da zeína foi alcançada quando o grau de intumescimento fosse relativamente menor, ou seja, quando menor quantidade de água estava presente na rede do gel.

Combinando os resultados da perda de água, intumescimento e permeação do azul de metileno, pode-se inferir que a incorporação de zeína ao hidrogel de alginato produziu uma rede mais compacta (poros menores) que possui um caráter mais plástico (maior razão de intumescimento), possivelmente devido à zeína agir como um agente de reticulação adicional (além dos íons de Ca^{2+}). Resultados semelhantes foram encontrados por Peng *et al* (2017) após a incorporação de óxido de grafeno (OG) em uma matriz de alginato/poli(N-isopropilacrilamida). Seus resultados mostraram que com o aumento de OG, os tamanhos de poros tornaram-se menores, devido à ligação de hidrogênio entre OG e a matriz polimérica, dessa maneira a taxa de intumescimento do hidrogel tornou-se maior.

Ainda sobre os hidrogéis de Alg e Alg:Z, ambos os hidrogéis podem ser utilizados como fase de extração para materiais orgânicos polares, que é o objetivo do dispositivo apresentado neste trabalho. Conforme constatado anteriormente, uma maior quantidade de água dentro da rede polimérica não implica que haja uma maior extração de compostos polares, pois é evidente que são os grupos funcionais adicionados ao hidrogel que influenciam na seletividade de extração.

Observando os gráficos de espectroscopia na região do infravermelho – reflectância total atenuada (IS-ATR) – as diferenças entre os materiais podem ser observadas nas FIGURA 28 e FIGURA 29. Primeiramente, a diferença nas intensidades das bandas na região de 3400 cm^{-1} é evidente, sendo esta uma característica da ligação grupo hidroxila (O-H) (Silverstein; Webster (1998)) presente no alginato e na zeína. A segunda diferença aparente é que apenas o espectro de fibras PP existe a banda correspondente ao alongamento sp^3 C-H, a 2800 cm^{-1} (Silverstein; Webster (1998)), característica da estrutura de polipropileno, que é constituinte da fibra utilizada para suporte dos hidrogéis.

FIGURA 28: Sobreposição dos espectros de infravermelho dos materiais: fibra PP, fibra PP recoberta com o hidrogel de Alg e fibra PP recoberta com o hidrogel Alg:Z.

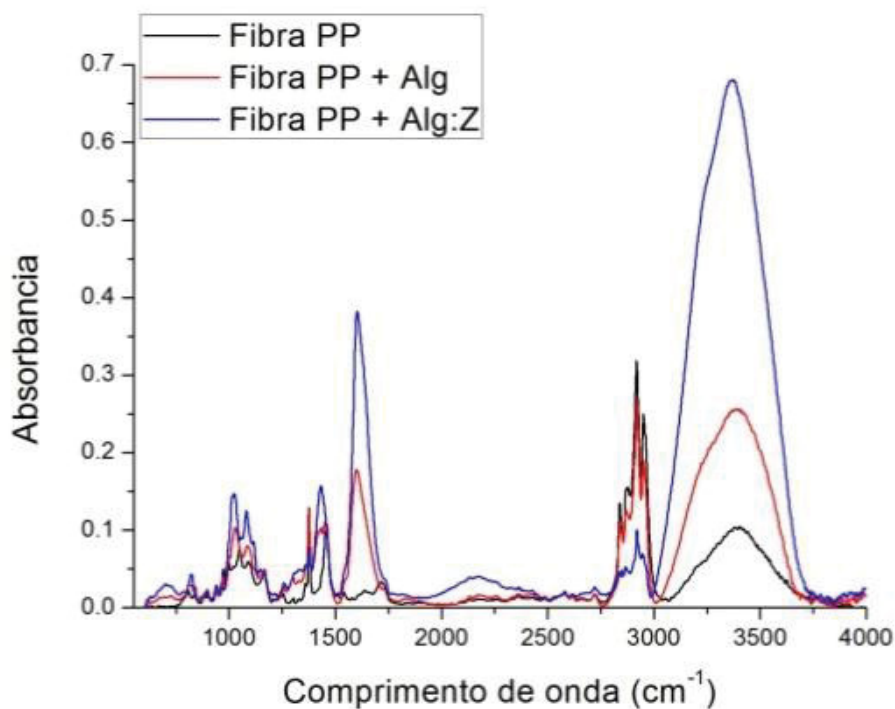
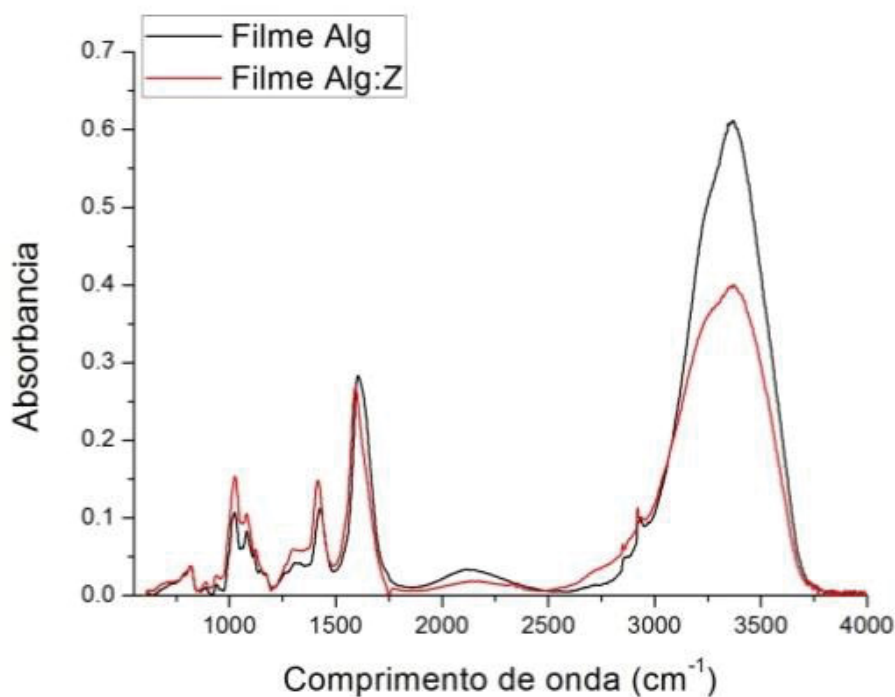


FIGURA 29: Sobreposição dos espectros de infravermelho dos materiais: filme de Alg e filme de Alg:Z.



Os aspectos morfológicos dos materiais podem ser observados na FIGURA 30, sendo estas imagens em corte frontais da fibra PP (FIGURA 30a) e da fibra PP após

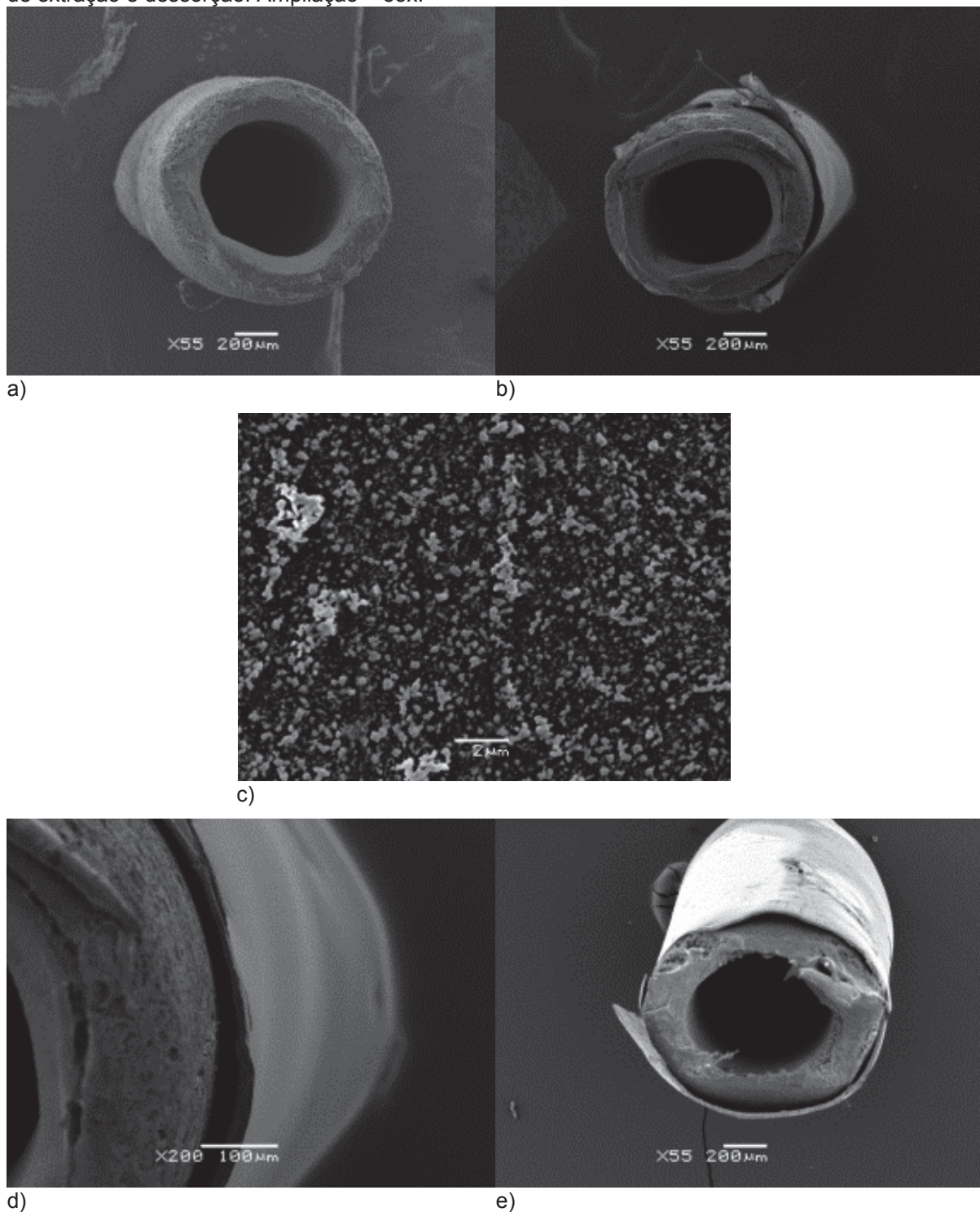
suportar a blenda do hidrogel (FIGURA 30b e FIGURA30d). Inicialmente, acreditava-se na hipótese de que o hidrogel poderia ser adsorvido nos poros da fibra, conforme relatado por Basheer *et al* (2005a, 2006), já que a fibra selecionada apresenta poros da ordem de 0,2 μm . No entanto, as imagens de microscopia eletrônica de varredura demonstraram que o hidrogel não penetra na estrutura porosa, mas sim atua como uma camada superficial externa à fibra PP. Como tal, a fase extratora baseada em hidrogel encontra-se envolta em torno da fibra, na forma de um filme fino e frágil. Especialmente quando seco (desidratado), a fibra torna-se extremamente frágil, o que dificultou o seu manuseio devido às suas propriedades mecânicas fracas, como é típico para a maioria dos géis desidratados de polímeros naturais (Akhtar *et al* (2015)). Por isso, é recomendável que o dispositivo seja estocado em meio aquoso, entre extrações sucessivas ou mesmo após o seu preparo, sendo este o procedimento adotado neste trabalho.

A característica de uma fase extratora recobrimdo a fibra PP pode ser considerada promissora no que se refere à aplicação de hidrogéis para processos de extração, pois a fase de sorção está na superfície externa da fibra, semelhante ao que ocorre em filmes de polidimetilsiloxano (PDMS), fibras SPME comerciais (Ligor *et al* (2004)), facilitando as interações entre analitos e fase extratora durante a extração, ao mesmo tempo que viabiliza, de maneira relativamente rápida, a dessorção dos mesmos da fibra para o extrato a ser injetado no sistema GC-MS/MS.

Uma imagem mais próxima dos hidrogéis de Alg:Z secos, não suportados na fibra PP, também foi obtida (FIGURA 30c). Nesta imagem observa-se as nanopartículas de zeína na superfície do filme, o que sugere que o hidrogel possui um caráter mais hidrofóbico, indo de acordo com os testes de permeabilidade já realizados. Tal característica, como discutido anteriormente, proporciona maiores taxas de recuperação para analitos de caráter anfifílico.

A estabilidade do hidrogel suportado na superfície da fibra foi avaliada após 5 extrações e dessorções sequenciais, com etapas de limpeza entre as mesmas. De acordo com a FIGURA 30e, pode-se enfatizar que a reutilização do dispositivo, em termos de estabilidade estrutural do filme, é possível, uma vez que este permanece intacto após múltiplas extrações. A eficiência de extração associada à reutilização da fibra já foi discutida anteriormente.

FIGURA 30: Imagens de microscopia eletrônica de varredura: a) fibra PP nua, b) fibra PP com Alg:Z. Ampliação – 55x; c) filme de Alg:Z. Ampliação – 7Kx; d) imagem do hidrogel de Alg:Z suportado na fibra PP. Ampliação – 200x; e) fibra PP com hidrogel de Alg:Z após o procedimento de extração e dessorção. Ampliação – 55x.



5.6 ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE MÉRITO

Para demonstrar a aplicabilidade do dispositivo desenvolvido como fase extratora para CE, realizou-se a análise de alguns parâmetros de mérito. Constatou-se satisfatória

seletividade para o método, uma vez que a capacidade de determinar um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz foi possível pela boa resolução cromatográfica alcançada e o fato que as análises qualitativa e quantitativa foram realizadas nos modos MRM e SIM, que garantem seletividade, em especial para o modo MRM, na detecção de compostos orgânicos através da seleção de razões m/z e/ou transições específicas.

Com relação à linearidade, estudou-se uma faixa de concentração de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ a $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ a qual foi selecionada por ser correspondente a concentração geralmente encontrada, e descrita na literatura, em matrizes aquosas semelhantes (Cappellini (2008), Dallegrave (2012), Garcia (2011) e Verbinen *et al* (2010)). O intervalo linear, onde a resposta encontrada é diretamente proporcional à concentração do analito, se deu para a faixa de LQ ($0,1$ ou $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, com coeficientes de regressão linear (R^2) superiores a 0,99. Os 14 analitos apresentaram para o LQ valores de RSD inferiores a 19,4% e exatidão entre 81,2% a 118,0% (TABELA 19).

TABELA 19: Parâmetros de regressão linear e LQ do método SPME-GC-MS/MS proposto.

Analito	Regressão linear				LQ (n=3)		
	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Inclinação (<i>slope</i>)	Intercepto	R^2	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Exatidão (%)
IBU	0,1 - 100	0,0506	0,3221	0,9977	0,100	13,04	81,2
PTM	0,5 - 100	0,0020	0,0789	0,9957	0,500	10,60	97,7
ATZ	0,1 - 100	1,5911	-6,1756	0,9953	0,100	12,86	115,4
4OP	0,1 - 100	1,0473	15,371	0,9953	0,100	9,69	101,9
CAF	0,1 - 100	0,0068	-0,0052	0,9979	0,100	15,74	118,0
4NP	0,1 - 100	1,1748	11,742	0,9936	0,100	7,37	103,8
TRI	0,1 - 100	1,1621	0,1513	0,9938	0,100	4,82	108,7
BPA	0,1 - 100	0,2621	1,7618	0,9987	0,100	15,32	111,6
E1	0,1 - 100	0,0866	0,1620	0,9973	0,100	14,64	102,8
E2	0,1 - 100	0,0718	0,2033	0,9966	0,100	17,54	116,5
TES	0,1 - 100	0,5689	0,3927	0,9966	0,100	19,38	83,3
EE2	0,1 - 100	0,0359	-0,0692	0,9900	0,100	16,77	117,0
PRO	0,1 - 100	0,0118	0,0343	0,9974	0,100	16,52	87,2
E3	0,5 - 100	0,0168	0,0903	0,9985	0,500	2,60	102,9

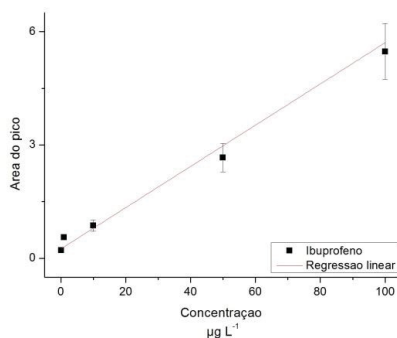
R^2 : coeficiente de regressão linear; LQ: limite de quantificação; RSD: desvio padrão relativo.

Por outro lado, o limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, fato que será de extrema importância para a identificação de compostos presentes em amostras reais. Neste trabalho, o LD foi calculado como sendo a menor concentração de cada analito capaz de

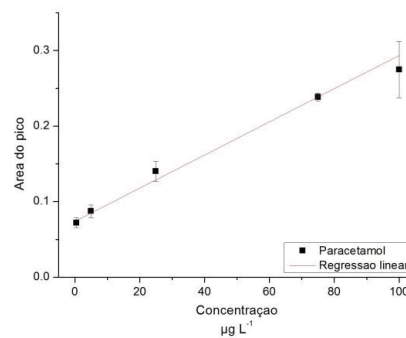
gerar uma razão sinal/ruído igual 3. Desta maneira, o LD para o método proposto variou entre 0,05 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As FIGURA 31 e FIGURA 32 deste texto apresentam as curvas analíticas obtidas para a extração dos 14 analitos no intervalo de concentração de LQ a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. As extrações foram realizadas em triplicata, sendo que todas as curvas apresentam 5 níveis de concentração.

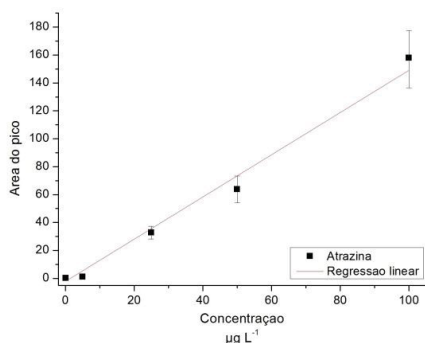
FIGURA 31: Curvas analíticas extraídas dos analitos IBU, PTM, ATZ, 4OP, CAF e 4NP.



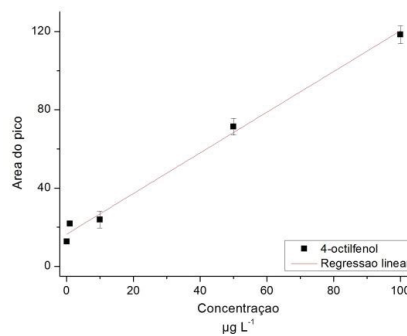
$$R^2 = 0,9977; y = 0.0506x + 0.3221$$



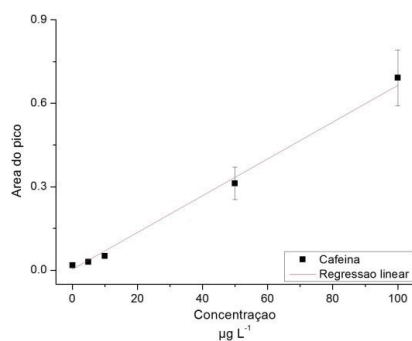
$$R^2 = 0,9915; y = 0,002x + 0,0789$$



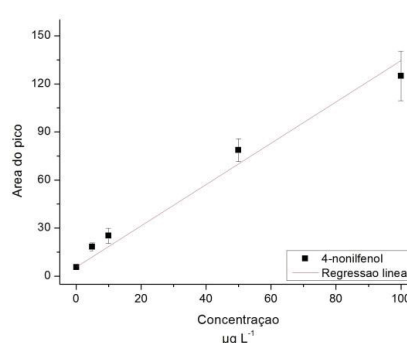
$$R^2 = 0,9953; y = 1,5911x - 6,1756$$



$$R^2 = 0,9953; y = 1,0473x + 15,371$$

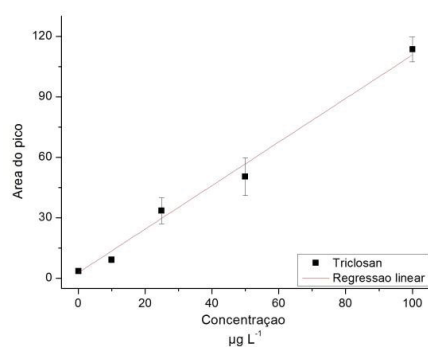


$$R^2 = 0,9979; y = 0,0068 - 0,0052$$

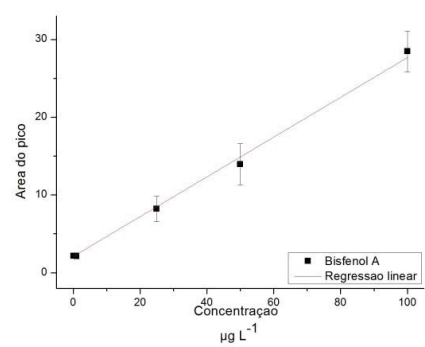


$$R^2 = 0,9936; y = 1,1748x + 11,742$$

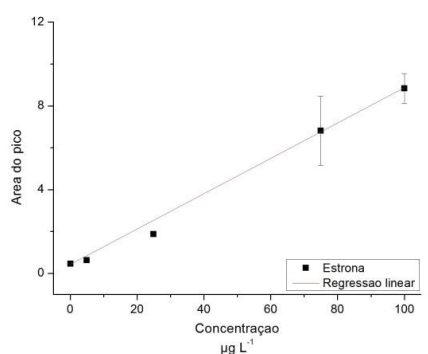
FIGURA 32: Curvas analíticas extraídas dos analitos TRI, BPA, E1, E2, TES, EE2, PRO e E3.



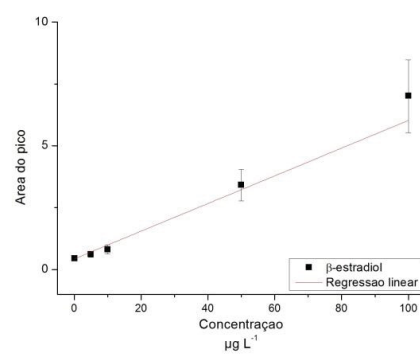
$$R^2 = 0,9938; y = 1,1621x + 0,1513$$



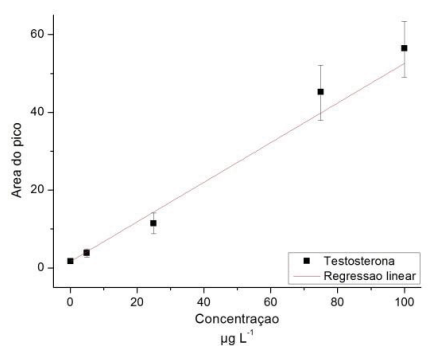
$$R^2 = 0,9987; y = 0,2621x + 1,7618$$



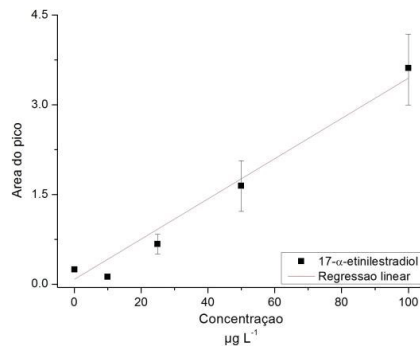
$$R^2 = 0,9973; y = 0,0866x + 0,1620$$



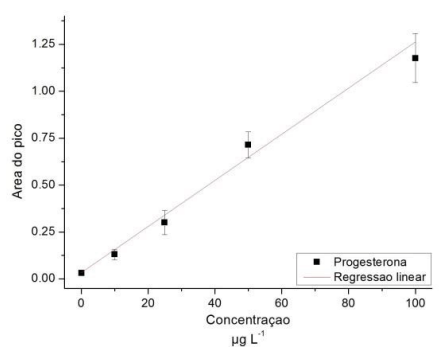
$$R^2 = 0,9966; y = 0,0718x + 0,2033$$



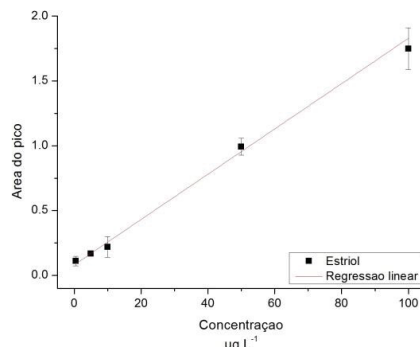
$$R^2 = 0,9966; y = 0,5689x + 0,3927$$



$$R^2 = 0,9900; y = 0,0359x - 0,0692$$



$$R^2 = 0,9974; y = 0,0118x + 0,0343$$



$$R^2 = 0,9985; y = 0,0168x + 0,0903$$

Os resultados dos experimentos que avaliam a proximidade dos resultados obtidos com a curva analítica são chamados de precisão intra-ensaio e inter-ensaio ou repetibilidade (TABELA 20). Estes foram realizados em triplicata, utilizando diferentes dispositivos (um para cada extração), em 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto), sendo obtidos valores de desvio padrão relativo inferiores a 20,0%, com exceção do inter-ensaio da PRO de concentração $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Porém, deve-se ressaltar que esse hormônio apresenta, normalmente, uma variância maior em seus resultados como foi constatado experimentalmente e descrito na literatura (Sampaio (2017)). Nestes ensaios, a exatidão apresentou valores entre 80 e 120%, para todos os analitos. Em suma, pelos resultados apresentados nesta etapa, pode-se inferir satisfatória repetibilidade e exatidão do método proposto, o qual é relacionado ao desenvolvimento de uma técnica de extração *labmade*.

A robustez da fibra SPME desenvolvida, baseada em hidrogel de alginato e zeína, bem como o estudo de repetibilidade foram avaliadas através do estudo da reutilização dos dispositivos no qual uma única fibra de extração foi utilizada por 5 vezes consecutivas, sob as mesmas condições analíticas. Vale ressaltar que, durante a realização dos experimentos, as fibras foram expostas a diferentes solventes (água para a extração, metanol para a dessorção e acetona e hexano para a limpeza), a diferentes temperaturas e sob agitação mecânica. Considerando-se este fato, é plausível considerar boa robustez da fase extratora baseada em hidrogel, pois a mesma foi capaz de resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos indicando boa confiabilidade durante o uso. A estabilidade estrutural da blenda de hidrogel após o reuso foi apresentada na seção de caracterização físico-química do material.

Em relação à eficiência de extração quando utilizada uma mesma fibra, foram atingidos valores de desvios padrão satisfatórios nesses ensaios (de 0,8%, para o 4OP, a 19,3%, para a PRO). Desta forma, é possível confirmar a viabilidade da reutilização do dispositivo proposto, no que diz respeito à estabilidade do hidrogel, bem como à eficiência de extração para múltiplas extrações. Apesar da avaliação de reuso ter sido para um relativo baixo número de extrações, esta característica é de extrema importância no que se refere à busca de um novo material de fácil síntese e de baixo custo para a aplicação proposta.

Apesar das fibras comerciais de SPME também apresentarem a possibilidade de reutilização, atualmente, há ainda um número limitado dessas fases, especialmente para a determinação de compostos polares em meio aquoso. Este fato é relatado como sendo um desafio analítico devido à baixa afinidade desses compostos com as fases de extração comerciais. Algumas fases de extração comerciais já foram empregadas com sucesso para a determinação/extração de contaminantes orgânicos de amostras de água

como CW/TPR (Hu *et al* (2006)), PA (Quintana *et al* (2004)) e PDMS–DVB (Tomkins; Ilgner (2002)). No entanto, o alto custo, a fraca seletividade e a fraca eficiência de extração para compostos polares são desvantagens comuns listadas para os dispositivos SPME.

TABELA 20: Parâmetros de precisão e exatidão do método SPME-GC-MS/MS proposto para as amostras feitas em laboratório.

Analito	Intra-ensaios (n=3)				Inter-ensaios (n=3)			
	Conc. teórica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Conc. medida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Exatidão (%)	Conc. teórica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Conc. medida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Exatidão (%)
IBU	0,50	$0,48 \pm 0,05$	10,2	96,1	0,50	$0,41 \pm 0,09$	19,4	82,3
	25,0	$24,1 \pm 2,8$	11,2	96,4	5,0	$4,5 \pm 0,9$	17,6	90,3
	60,0	$62,1 \pm 5,1$	8,5	103,5	75,0	$65,1 \pm 7,1$	9,5	86,8
PTM	0,50	$0,50 \pm 0,10$	20,0	100,1	0,50	$0,51 \pm 0,09$	18,6	102,0
	25,0	$24,7 \pm 1,1$	4,4	98,8	1,0	$1,2 \pm 0,1$	13,3	119,2
	60,0	$58,5 \pm 3,3$	5,5	97,5	50,0	$48,5 \pm 5,3$	10,6	97,7
ATZ	0,50	$0,54 \pm 0,09$	18,2	108,0	0,50	$0,60 \pm 0,03$	6,8	119,7
	25,0	$28,9 \pm 2,0$	8,0	115,6	10,0	$11,7 \pm 1,2$	12,3	117,0
	60,0	$61,3 \pm 6,0$	10,4	102,2	75,0	$77,4 \pm 9,0$	12,0	103,2
4OP	0,50	$0,52 \pm 0,02$	3,8	104,0	0,50	$0,53 \pm 0,02$	4,2	106,2
	25,0	$24,1 \pm 1,6$	6,4	96,4	5,0	$4,4 \pm 0,6$	12,6	88,3
	60,0	$60,9 \pm 1,3$	2,2	101,5	75,0	$67,6 \pm 4,3$	5,7	90,1
CAF	0,50	$0,47 \pm 0,02$	3,0	94,3	0,50	$0,49 \pm 0,03$	5,8	98,8
	25,0	$23,1 \pm 0,9$	3,6	92,4	1,0	$1,0 \pm 0,1$	6,1	100,2
	60,0	$65,0 \pm 7,9$	13,1	108,3	75,0	$75,7 \pm 5,9$	7,9	101,2
4NP	0,50	$0,52 \pm 0,01$	2,4	104,2	0,50	$0,51 \pm 0,07$	14,2	102,8
	25,0	$27,2 \pm 2,6$	10,4	108,8	1,0	$1,2 \pm 0,1$	6,5	120,2
	60,0	$65,2 \pm 4,7$	7,7	108,6	75,0	$76,2 \pm 5,8$	7,7	101,6
TRI	0,50	$0,51 \pm 0,02$	3,8	102,3	0,50	$0,55 \pm 0,05$	10,2	110,1
	25,0	$25,3 \pm 0,6$	2,3	101,2	5,0	$5,3 \pm 0,3$	6,6	106,0
	60,0	$68,9 \pm 7,0$	11,7	114,8	75,0	$79,9 \pm 6,9$	9,2	106,5
BPA	0,50	$0,47 \pm 0,03$	6,2	94,3	0,50	$0,45 \pm 0,04$	9,2	90,1
	25,0	$27,2 \pm 1,9$	7,6	108,9	10,0	$11,9 \pm 0,8$	8,1	119,0
	60,0	$65,3 \pm 7,6$	12,8	109,1	75,0	$67,4 \pm 9,5$	12,3	89,9
E1	0,50	$0,52 \pm 0,01$	2,4	104,4	0,50	$0,54 \pm 0,04$	8,2	108,2
	25,0	$24,6 \pm 2,9$	11,6	98,4	10,0	$10,9 \pm 0,9$	9,3	109,3
	60,0	$58,0 \pm 10,6$	17,7	96,7	50,0	$52,0 \pm 9,8$	19,6	104,2
E2	0,50	$0,53 \pm 0,02$	3,8	106,6	0,50	$0,55 \pm 0,03$	6,2	110,6
	25,0	$23,3 \pm 4,0$	16,0	93,5	25,0	$24,4 \pm 4,2$	16,8	97,6
	60,0	$57,5 \pm 6,1$	10,7	95,8	75,0	$77,7 \pm 8,4$	11,2	103,6
TES	0,50	$0,47 \pm 0,03$	6,0	94,4	0,50	$0,49 \pm 0,04$	8,6	98,9
	25,0	$21,9 \pm 1,6$	6,4	87,5	10,0	$9,8 \pm 2,2$	22,0	98,0
	60,0	$59,0 \pm 7,8$	13,0	98,3	50,0	$49,0 \pm 9,0$	18,4	97,7
EE2	0,50	$0,43 \pm 0,02$	4,2	86,6	0,50	$0,48 \pm 0,07$	14,0	96,1
	25,0	$25,1 \pm 4,6$	18,5	100,4	5,0	$4,8 \pm 0,9$	18,3	95,9
	60,0	$57,2 \pm 9,1$	15,2	95,3	75,0	$73,2 \pm 9,6$	12,8	97,5
PRO	0,50	$0,49 \pm 0,06$	11,6	98,9	0,50	$0,48 \pm 0,01$	2,4	98,6
	25,0	$24,8 \pm 3,0$	12,0	99,2	5,0	$4,8 \pm 0,1$	1,9	96,2
	60,0	$61,2 \pm 8,6$	14,4	102,0	75,0	$72,9 \pm 7,5$	10,2	97,2
E3	0,50	$0,59 \pm 0,07$	13,4	118,8	0,50	$0,51 \pm 0,01$	2,6	102,9
	25,0	$25,9 \pm 3,5$	14,0	103,6	25,0	$24,9 \pm 2,2$	8,8	99,6
	60,0	$67,3 \pm 8,9$	14,9	112,2	75,0	$77,1 \pm 9,6$	12,8	102,8

Analizou-se também a estabilidade das soluções padrões com o passar de aproximadamente 1 ano após ciclos congelar e descongelar (estabilidade das soluções padrão) e estabilidade após processamento (extração e derivatização). Para o primeiro caso, os dados de áreas dos picos provenientes das injeções de tais amostras foram comparados com as áreas de picos de cada um dos analitos quando recém preparados no mesmo solvente, não houve diferença visual entre as áreas dos picos, ou seja, as soluções de padrões conseguem suportar os diversos ciclos e permanecerem estáveis. No caso da estabilidade após processamento, um intervalo de 24 h foi avaliado entre duas injeções sequenciais e também não houve diferença entre as áreas dos picos. Não foram avaliados intervalos maiores devido à metodologia prezar por análises relativamente próximas do horário de injeção.

5.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO SPME-GC-MS/MS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS SUPERFICIAIS

Após o desenvolvimento do dispositivo e sua viabilidade em termos de validação analítica ser comprovada, aplicou-se o método para a análise de amostras de águas superficiais do rio Belém (Curitiba – PR), coletadas em março de 2017. Neste estudo, deve-se destacar que o interesse não foi a avaliação do comprometimento da qualidade das águas deste rio, mas sim, aplicar a metodologia proposta com a nova fase extratora desenvolvida. Foram amostrados 3 pontos ao longo do curso do rio, sendo que em todos os pontos coletados foram detectados mais de um analito em concentrações superiores aos seus limites de quantificação. Na TABELA 21 podem ser visualizados todos os resultados da determinação dos compostos de interesse nas amostras de águas do rio Belém.

No ponto 1, localizado a apenas 500 m da nascente do rio, foram identificados os analitos: CAF, 4NP, E1, E2, TES e EE2. A presença destes pode ser relacionada com o fato de haver neste local ocupações irregulares próximas a margem do rio Belém, as quais não possuem sistema adequado de coleta de esgoto e acabam sendo alvo do descarte irregular por meio de ligações clandestinas. Já no ponto 2, localizado na região central de Curitiba, que possui alta densidade populacional e recebe tanto esgoto doméstico quanto resíduos sólidos produzidos nessa região, pôde-se identificar os compostos CAF, E1, E2, TES e EE2. No último ponto de coleta, ponto 3, situado a montante de ETE Belém e altamente degradado foi possível quantificar alguns compostos avaliados neste trabalho, com destaque para a TES, cuja concentração obtida ($6,32 \mu\text{g L}^{-1}$) foi a maior dentre todos os analitos estudados. Esses resultados são suficientes para demonstrar que a fase desenvolvida pode ser empregada em amostras

complexas, como águas superficiais. Além de que, trabalhos encontrados na literatura com referência ao mesmo rio, e a mesma cidade, apresentaram valores de quantificação para alguns dos compostos de interesse, como ibuprofeno, paracetamol e cafeína (Ide, A. (2014); Ide; A. (2014) e Kramer *et al* (2015)), da mesma ordem de grandeza, assegurando que o método desenvolvido é congruente com os utilizados atualmente por outros pesquisadores.

TABELA 21: Concentrações dos analitos detectados nos pontos coletados no rio Belém.

Analitos	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
IBU	ND	ND	< LQ
PTM	< LQ	ND	ND
ATZ	< LQ	ND	< LQ
4OP	< LQ	< LQ	2,78
CAF	0,76	0,54	ND
4NP	0,17	ND	3,42
TRI	ND	ND	1,74
BPA	< LQ	< LQ	0,64
E1	1,53	3,87	< LQ
E2	0,76	1,73	< LQ
TES	5,93	0,56	6,32
EE2	3,92	1,92	1,57
PRO	ND	ND	1,08
E3	< LQ	< LQ	< LQ

LQ – Limite de quantificação; ND – não detectado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Neste trabalho foi proposto um novo dispositivo SPME para extração e determinação por GC-MS/MS de contaminantes emergentes em matrizes aquosas. O novo material, baseado na incorporação do hidrogel de Alg:Z na superfície de uma fibra PP resultou em uma fase de síntese simples e eficiente para a extração de compostos com diferentes polaridades em amostras aquosas. Além disso, a fase proposta se mostrou passível de ser reutilizada em extrações consecutivas, pois a eficiência da mesma se manteve satisfatória e nenhum efeito de memória foi evidenciado. Apesar da reutilização de fibras SPME ser comum para as fases comerciais, a fase desenvolvida neste trabalho possui vantagens como o seu relativo baixo custo e a sua estabilidade em solventes orgânicos.

O método desenvolvido para a avaliação do dispositivo, GC-MS/MS, apresentou linearidade para o intervalo de LQ ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ a $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, com valores de coeficiente de determinação superiores a 0,99. O método se mostrou com satisfatória exatidão (81,2% a 118,0%), enquanto ensaios de precisão resultaram em desvios padrão entre 1,9% a 22,0%. Esses resultados indicam o potencial uso da fase/dispositivo para fins quantitativos para os analitos em meio aquoso em intervalos de concentração geralmente descritos na literatura. O método padronizado e validado foi, por fim, aplicado em matriz real, no caso, amostras de água do rio Belém (Curitiba/PR).

A avaliação das propriedades físico-químicas do hidrogel de Alg:Z provou que o teor de água dentro da matriz de hidrogel e os grupos funcionais presentes são muito importantes para garantir seletividade para extração dos analitos, especialmente quando comparados com a fibra PP com nenhuma modificação. Além disso, como especial vantagem da fase proposta, destaca-se seu caráter anfifílico, garantindo eficiência de extração tanto para compostos orgânicos de média e alta polaridade. Por fim, considera-se que esse trabalho fornece um dos primeiros passos para um estudo abrangente sobre o potencial do hidrogel como fase seletiva e de baixo custo para sorção de compostos orgânicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, M. F.; HANIF, M.; RANJHA, N. M. Methods of synthesis of hydrogels... A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.022>%5Cn<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319016415000857>>.

ALCÂNTARA, A. C. S.; ARANDA, P.; DARDER, M.; et al. Bionanocomposites based on alginate–zein/layered double hydroxide materials as drug delivery systems. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 42, p. 9495–9504, 2010. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c0jm01211d>>.

ALGOTHMI, W. M.; BANDARU, N. M.; YU, Y.; SHAPTER, J. G.; ELLIS, A. V. Alginate-graphene oxide hybrid gel beads: An efficient copper adsorbent material. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 397, p. 32–38, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2013.01.051>>.

ALMEIDA, J. F. D. S. **Preparação e Caracterização de Hidrogéis para Aplicações Biomédicas**, 2010. Universidade de Coimbra.

ANNAMALAI, J.; NAMASIVAYAM, V. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. **Environment International**, v. 76, p. 78–97, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.12.006>>.

ANVISA. RDC N. 166, de 25 de Julho de 2017, Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Ministerio da Saúde**, v. 2017, p. 1–21, 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>.

ARROYO, D.; ORTIZ, M. C.; SARABIA, L. A. Multiresponse optimization and parallel factor analysis, useful tools in the determination of estrogens by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1–2, p. 358–368, 2007.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990.

AZZOUZ, A.; BALLESTEROS, E. Combined microwave-assisted extraction and

continuous solid-phase extraction prior to gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals, personal care products and hormones in soils, sediments and sludge. **Science of the Total Environment**, v. 419, p. 208–215, 2012.

BAGHERI, H.; SABER, A.; MOUSAVI, S. R. Immersed solvent microextraction of phenol and chlorophenols from water samples followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, n. 1–2, p. 27–33, 2004.

BAGHERI, H.; SARAJI, M. Conductive polymers as new media for solid-phase extraction: Isolation of chlorophenols from water sample. **Journal of Chromatography A**, v. 986, n. 1, p. 111–119, 2003.

BAHRAM, M.; KESHVARI, F.; NAJAFI-MOGHADDAM, P. Development of cloud point extraction using pH-sensitive hydrogel for preconcentration and determination of malachite green. **Talanta**, v. 85, n. 2, p. 891–896, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.074>>.

BARROS, H. D. **Estudo da exposição do consumidor aos plastificantes ftalato e adipato de di-(2-etil-hexila) adicionados a filmes de PVC, utilizados para acondicionamento de alimentos gordurosos**, 2010. Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <<http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/8243>>.

BASHEER, C.; JAYARAMAN, A.; KEE, M. K.; VALIYAVEETTIL, S.; LEE, H. K. Polymer-coated hollow-fiber microextraction of estrogens in water samples with analysis by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1100, p. 137–143, 2005a.

BASHEER, C.; JAYARAMAN, A.; KEE, M. K.; VALIYAVEETTIL, S.; LEE, H. K. Polymer-coated hollow-fiber microextraction of estrogens in water samples with analysis by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1100, n. 2, p. 137–143, 2005b.

BASHEER, C.; NARASIMHAN, K.; YIN, M.; et al. Application of micro-solid-phase extraction for the determination of persistent organic pollutants in tissue samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, n. 1–2, p. 358–364, 2008.

BASHEER, C.; SURESH, V.; RENU, R.; LEE, H. K. Development and application of

polymer-coated hollow fiber membrane microextraction to the determination of organochlorine pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1033, n. 2, p. 213–220, 2004.

BASHEER, C.; WANG, H.; JAYARAMAN, A.; VALIYAVEETIL, S.; LEE, H. K. Polymer-coated hollow fiber microextraction combined with on-column stacking in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1128, n. 1–2, p. 267–272, 2006.

BECKER, R. W. **Determinação de anti-inflamatórios em efluente urbano na região de Porto Alegre-RS por SPE, derivatização e GC-MS**, 2012. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530, 2003.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BONACIN, R. F. **Hidrogéis de PVP e blendas de PVP / polianidridos como potenciais curativos para feridas crônicas**, 2011. Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46136/tde-05122011-140143/pt-br.php>>.

BONFLEUR, E. **Comportamento da associação entre os herbicidas glifosato e atrazina em um Latossolo vermelho-escuro do bioma cerrado brasileiro**, 2010. Universidade de São Paulo.

BRAGA, O.; SMYTHE, G. A.; SCHÄFER, A. I.; FEITZ, A. J. Steroid estrogens in ocean sediments. **Chemosphere**, v. 61, p. 827–833, 2005.

BUNKOED, O.; KANATHARANA, P. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons with a magnetic sorbent composed of alginate, magnetite nanoparticles and multiwalled carbon nanotubes. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 7–8, p. 1519–1526, 2015.

CAMPOS, D. R. DE; YONAMINE, M.; ALVES, M. J. D. N. N.; MOREAU, R. L. D. M. Determinação de esteróides androgênicos anabólicos em urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 4, p. 467–476, 2005.

CAPPELLINI. **Análise dos pesticidas ametrina, atrazina, diuron e fipronil em amostras de água do Ribeirão do Feijão – São Carlos – SP**, 2008. Universidade de São Paulo.

CARVALHO. **Estudo para a implantação de um método de análise de benzedina em água em uma empresa de análise ambiental na região sul**, 2011. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CAVALLARO, G.; GIANGUZZA, A.; LAZZARA, G.; MILIOTO, S.; PIAZZESE, D. Alginate gel beads filled with halloysite nanotubes. **Applied Clay Science**, v. 72, p. 132–137, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2012.12.001>>.

CHATERJI, S.; KWON, I. K.; PARK, K. Smart polymeric gels: Redefining the limits of biomedical devices. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, p. 1083–1122, 2007.

CHAVES, A. R.; CHIERICATO JÚNIOR, G.; QUEIROZ, M. E. C. Solid-phase microextraction using poly(pyrrole) film and liquid chromatography with UV detection for analysis of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2009.

CHEN, C.-E.; ZHANG, H.; JONES, K. C. A novel passive water sampler for in situ sampling of antibiotics. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, n. 6, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/c2em30091e>>.

CHO, S. Y.; LEE, S. Y.; RHEE, C. Edible oxygen barrier bilayer film pouches from corn zein and soy protein isolate for olive oil packaging. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 1234–1239, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.014>>.

COLAÇO, R. **Determinação de diclofenaco e ibuprofeno em matrizes aquosas por EFS-CLAE-UV**, 2013. Universidade Federal do Paraná.

DALLEGRAVE. **Determinação de hormônios estrógenos e progestágenos em amostras ambientais por GC-MS**, 2012. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DALMÁZIO, I.; ALVES, T. M. A.; AUGUSTI, R. An appraisal on the degradation of paracetamol by TiO₂/UV system in aqueous medium. Product identification by gas

chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 1, p. 81–88, 2008.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 907–938, 1999.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 442–448, 2011. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>>.

DONIKE, M.; HORNING, S.; MANDEL, F.; SCHÄNZER, W. Screening for non-steroidal anti-inflammatory drugs: using trimethylsilyl derivatives and gas chromatography/mass spectrometry. **Proceedings of the 6th International Conference of Racing Analysis and Veterinarians**, 1985.

ERICKSON, D. P.; RENZETTI, S.; JURGENS, A.; CAMPANELLA, O. H.; HAMAKER, B. R. Modulating state transition and mechanical properties of viscoelastic resins from maize zein through interactions with plasticizers and co-proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 60, n. 3, p. 576–583, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2014.08.001>>.

ERIKSSON, C.; ENEROTH, P. Studies on the Interaction between Human Serum Protein Fractions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 6, p. 2824–2829, 1988.

FARMACOPÉIA DO BRASIL. Farmacopeia Brasileira Volume 1. , v. 1, p. 546, 2010.

FARRÉ, M. LA; PÉREZ, S.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 991–1007, 2008.

FERNANDES. **Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de Pseudomonas spp . envolvidas na biodegradação da atrazina** Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de Pseudomonas spp . envolvidas na biodegradação da atrazina, 2014. Universidade de São Paulo.

FERREIRA. **Desenvolvimento farmacêutico e validação do método analítico de uma suspensão contendo paracetamol**, 2010. Universidade de Coimbra.

FIGUEIREDO. **Avaliação da remoção de interferentes endócrinos, ativos farmacêuticos e cafeína em água para abastecimento público do estado de São Paulo**, 2014. Universidade de São Paulo.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry: Bioanalytical method validation**. 2001.

GARCIA. **Metodologia analítica para determinação de triclosan e clorofenóis por cromatografia a líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia por injeção sequencial (SIC) com uso de coluna monolítica e empacotada**, 2011. Universidade de São Paulo.

GERALDO, V. P. N. **Interação do ibuprofeno e capsaicinóides com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett contendo fosfolipídeos**, 2013. Universidade de São Paulo.

HAN, Y. L.; XU, Q.; LU, Z. Q.; WANG, J. Y. Preparation of transparent zein films for cell culture applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 120, p. 55–62, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.04.019>>.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 18–23, 2002.

HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry - Principles and Applications**. 2007.

HU, X.; PENG, J.; LIU, J.; JIANG, G.; JÖNSSON, J. Å. Evaluating the impacts of some environmentally relevant factors on the availability of bisphenol A with negligible-depletion SPME. **Chemosphere**, v. 65, n. 11, p. 1935–1941, 2006.

HUGO J. RIBEIRO JUNIOR, RODRIGO LUIZ MENDES MOTA, RAFAEL CORADI LEME, P. E. S. S. Ensaio Plackett-Bruman para identificação de elementos de custo tarifário de energia elétrica. **XXXIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção**, 2013.

IDE, A. H. **Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal no rio iguaçu e seus afluentes**, 2014. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

IDE, A. H.; AZEVEDO, J. C. R. DE. **Ocorrência e avaliação da remoção de produtos farmacêuticos por duas estações de tratamento de esgotos**, 2014. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

IPPUC. **Plano municipal de regularização Fundiária em áreas de preservação permanente, Curitiba**. Curitiba, 2007.

KABIRI, K.; ZOHURIAAN-MEHR, M. J. Superabsorbent hydrogel composites. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 14, n. November 2002, p. 438–444, 2003.

KRAMER, R. D.; MIZUKAWA, A.; IDE, A. H.; et al. Determinação de anti-inflamatórios na água e sedimento e suas relações com a qualidade da água na bacia do Alto Iguaçu , Curitiba-PR. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 20, n. 3, p. 657–667, 2015.

LAELORSPOEN, N.; WONGSASULAK, S.; YOOVIDHYA, T.; DEVAHASTIN, S. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in zein-alginate core-shell microcapsules via electrospraying. **Journal of Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 342–349, 2014.

LARDY-FONTAN, S.; LE DIOURON, V.; DROUIN, C.; et al. Validation of a method to monitor the occurrence of 20 relevant pharmaceuticals and personal care products in 167 bottled waters. **Science of The Total Environment**, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969717303157>>.

LEE, S.; KIM, Y. C.; PARK, J. H. Zein-alginate based oral drug delivery systems: Protection and release of therapeutic proteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, n. 1–2, p. 300–306, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.023>>.

LI, Y.; DU, Q.; LIU, T.; et al. Methylene blue adsorption on graphene oxide/calcium alginate composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 501–507, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.094>>.

LIGOR, M.; WÓJCIK, J.; BUSZEWSKI, B. Application of the Solid Phase Microextraction (Spme). **Journal of Food and Nutrition Science**, v. 13, n. 4, p. 355–362, 2004.

LIMA. **Otimização e validação de extração líquido-líquido microcontaminantes orgânicos em amostras de esgoto e análise por CG-EM**, 2013. Universidade Federal de Ouro Preto.

LIU, J.; YU, S.; YIN, Y.; CHAO, J. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 33, p. 95–106, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2011.10.010>>.

LIU, W.; WANG, H.; GUAN, Y. Preparation of stir bars for sorptive extraction using sol-gel technology. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, p. 15–22, 2004.

LOOS, R.; LOCORO, G.; COMERO, S.; et al. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. **Water Research**, v. 44, n. 14, p. 4115–4126, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.032>>.

LOPES, C. L. ET AL. Effect of low and high methoxyl citrus pectin on the properties of polypyrrole based electroactive hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, n. 2, p. 11–18, 2016.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 17–63, 2000.

MENDONÇA, T. G.; URBANO, V. R.; PERES, J. G.; SOUZA, C. F. Hidrogel como alternativa no aumento da capacidade de armazenamento de água no solo. **Water Resources and Irrigation Management**, p. 87–92, 2013.

MENEZES, H. C.; CARDEAL, Z. L. Desenvolvimento de um novo sistema de microextração em fase sólida com fibra resfriada. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 301–309, 2013.

MONTES, R.; RODRÍGUEZ, I.; RUBÍ, E.; RAMIL, M.; CELA, R. Suitability of polypropylene microporous membranes for liquid- and solid-phase extraction of halogenated anisoles from water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1198–1199, n. 1–2, p. 21–26, 2008.

MOTTALEB, M. A.; USENKO, S.; O'DONNELL, J. G.; et al. Gas chromatography-mass

spectrometry screening methods for select UV filters, synthetic musks, alkylphenols, an antimicrobial agent, and an insect repellent in fish. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 5, p. 815–823, 2009.

MÜLLER, S.; MÖDER, M.; SCHRADER, S.; POPP, P. Semi-automated hollow-fibre membrane extraction, a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 985, n. 1–2, p. 99–106, 2003.

MUNARETTO, J. S. **Determinação de disruptores endócrinos em filé de peixe utilizando QuEChERS modificado e GC-(TQ)MS/MS**, 2012. Universidade Federal de Santa Maria.

MUSTEATA, F. M.; PAWLISZYN, J. Assay of stability, free and total concentration of chlorhexidine in saliva by solid phase microextraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 1015–1024, 2005.

MUSTEATA, M. L.; MUSTEATA, F. M.; PAWLISZYN, J. Biocompatible solid-phase microextraction coatings based on polyacrylonitrile and solid-phase extraction phases. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 18, p. 6903–6911, 2007.

NEWTON, N.; ISOLADAS, M.; DO, C.; et al. **Estudo bioquímico e eletrofisiológico dos efeitos do triclosan (TRN) e da clorexidine (CHX) sobre mitocôndrias isoladas, células do epitélio oral e interações com materiais restauradores odontológicos**, 2006. Universidade Federal do Paraná.

ORATA, F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. **Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications**, p. 83–156, 2012. Disponível em: <<http://forensicscienceeducation.org/wp-content/uploads/2013/02/Analytical-derivatization-.pdf>>.

PAINTER, T. J. 4 – Algal Polysaccharides. **The Polysaccharides**. p.195–285, 1983.

PAL, A.; HE, Y.; JEKEL, M.; REINHARD, M.; GIN, K. Y. H. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. **Environment International**, v. 71, p. 46–62, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.025>>.

PENG, L.; LIU, Y.; GONG, J.; ZHANG, K.; MA, J. Continuous fabrication of multi-stimuli responsive graphene oxide composite hydrogel fibres by microfluidics. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 7, p. 19243–19249, 2017. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C7RA01750B>>.

PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.

PERES, F. DE O. **Estudo da dissociação do ibuprofeno utilizando matrizes de quitosana e montmorilonita/quitosana**, 2014. Universidade de São Paulo.

PETTA, T. **Técnicas modernas em espectrometria de massas aplicadas no isolamento de bioherbicidas produzidos por microrganismos**, 2008. Universidade de São Paulo.

QUINTANA, J. B.; CARPINTEIRO, J.; RODRÍGUEZ, I.; et al. Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, p. 177–185, 2004.

RICHA, C. A. **Finalização Do Plano Das Bacias Do Alto Iguaçu E Afluentes Do Alto**. Curitiba, 2013.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 4^o ed. Campinas, 2014.

RODRÍGUEZ, I.; TURNES, M. I.; MEJUTO, M. C.; CELA, R. Determination of chlorophenols at the sub-ppb level in tap water using derivatization, solid-phase extraction and gas chromatography with plasma atomic emission detection. **Journal of Chromatography A**, v. 721, n. 2, p. 297–304, 1996.

RUHÍ A., ACUNA V., BARCELÓ D., HUERTA B., MOR J., RODRÍGUES-MOZAZ S., S. S. Bioaccumulation and trophic magnification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in a Mediterranean river food web. **Science of the Total Environment**, v. 540, p. 250–259, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.009>>.

SACHER, F.; LANGE, F. T.; BRAUCH, H.-J.; BLANKENHORN, I. Pharmaceuticals in

groundwaters. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p. 199–210, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301012663>>.

SADAHIRA, C. M. **Síntese, caracterização e avaliação do perfil de liberação in vitro de hidrogéis de álcool polivinílico pH sensíveis processados por métodos físico-químicos**, 2007. Universidade Federal de Minas Gerais.

SADANALA, K. C.; LEE, J. A.; CHUNG, B. C.; CHOI, M. H. Targeted metabolite profiling: Sample preparation techniques for GC-MS-based steroid analysis. **Mass Spectrometry Letters**, v. 3, n. 1, p. 4–9, 2012.

SAMPAIO, N. M. F. M. **Avaliação de hidrogéis como fase extratora para determinação de hormônios em matrizes aquosas por GC-MS/MS**, 2017. Universidade Federal do Paraná.

DOS SANTOS PEREIRA, A.; DE AQUINO NETO, F. R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 370–379, 2000.

SCHALLEY, C. A. Supramolecular chemistry goes gas phase: The mass spectrometric examination of noncovalent interactions in host-guest chemistry and molecular recognition. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 194, n. 1, p. 11–39, 2000.

SHAREEF, A.; PARNIS, C. J.; ANGOVE, M. J.; WELLS, J. D.; JOHNSON, B. B. Suitability of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 β -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, n. 1–2, p. 295–300, 2004.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: The industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 3, p. 171–192, 2001.

SILVA, B. J. G.; LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C. In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 862, n. 1–2, p. 181–188, 2008.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F. Spectrometric Identification of Organic Compounds. ,

1998.

SZYRWIŃSKA, K.; KOŁODZIEJCZAK, A.; RYKOWSKA, I.; WASIAK, W.; LULEK, J. Derivatization and Gas Chromatography – Low-Resolution Mass Spectrometry of Bisphenol a. **Acta Chromatographica**, , n. 18, p. 49–58, 2007.

TEÓFILO, REINALDO F; FERREIRA, M. C. Qminiometria II: Planilhas Eletrônicas para Cálculo de Planejamentos Experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

TOMKINS, B. A.; ILGNER, R. H. Determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in ground water using solid phase microextraction (SPME) followed by gas chromatography with selected-ion monitoring. **Journal of Chromatography A**, v. 972, n. 2, p. 183–194, 2002.

VALADARES. **Avaliação de derivados sintéticos da testosterona pelo teste de mutação e recombinação somática (SMART) em Drosophila melanogaster**
Avaliação de derivados sintéticos da testosterona pelo teste de mutação e recombinação somática (SMART) em Drosophila me, 2007. Universidade Federal de Uberlândia.

VERBINNEN, R. T.; NUNES, G. S.; VIEIRA, E. M. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1837–1842, 2010.

WANG, S.; VINCENT, T.; FAUR, C.; GUIBAL, E. Alginate and Algal-Based Beads for the Sorption of Metal Cations: Cu(II) and Pb(II). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1453, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/17/9/1453>>.

WU, S.; ZHAO, X.; LI, Y.; et al. Adsorption of ciprofloxacin onto biocomposite fibers of graphene oxide/calcium alginate. **Chemical Engineering Journal**, v. 230, p. 389–395, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.06.072>>.

XU, H.; JIANG, Q.; REDDY, N.; YANG, Y. Hollow nanoparticles from zein for potential medical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 45, p. 18227, 2011. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2011/jm/c1jm11163a>>.

XU, J.; HE, S.; JIANG, R.; et al. Disposable solid-phase microextraction fiber coupled with gas chromatography-mass spectrometry for complex matrix analysis. **Analytical Methods**, v. 6, n. 13, p. 4895, 2014. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/ay/c4ay00230j>>.

ZEMOLIM, G. M. **Análise de estimulantes em suplementos alimentares e produtos naturais a base de plantas comercializadas para fins de emagrecimento no brasil**, 2015. Universidade Federal de Santa Maria.

ZHONG, Q.; JIN, M. Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersion. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2380–2387, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.015>>.

ZHOU, Y. Q.; WANG, Z. J.; JIA, N. Formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of 17 α -ethinylestradiol with BSTFA or MSTFA followed by gas chromatography-mass spectrometry determination. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 879–884, 2007.

APÊNDICE A

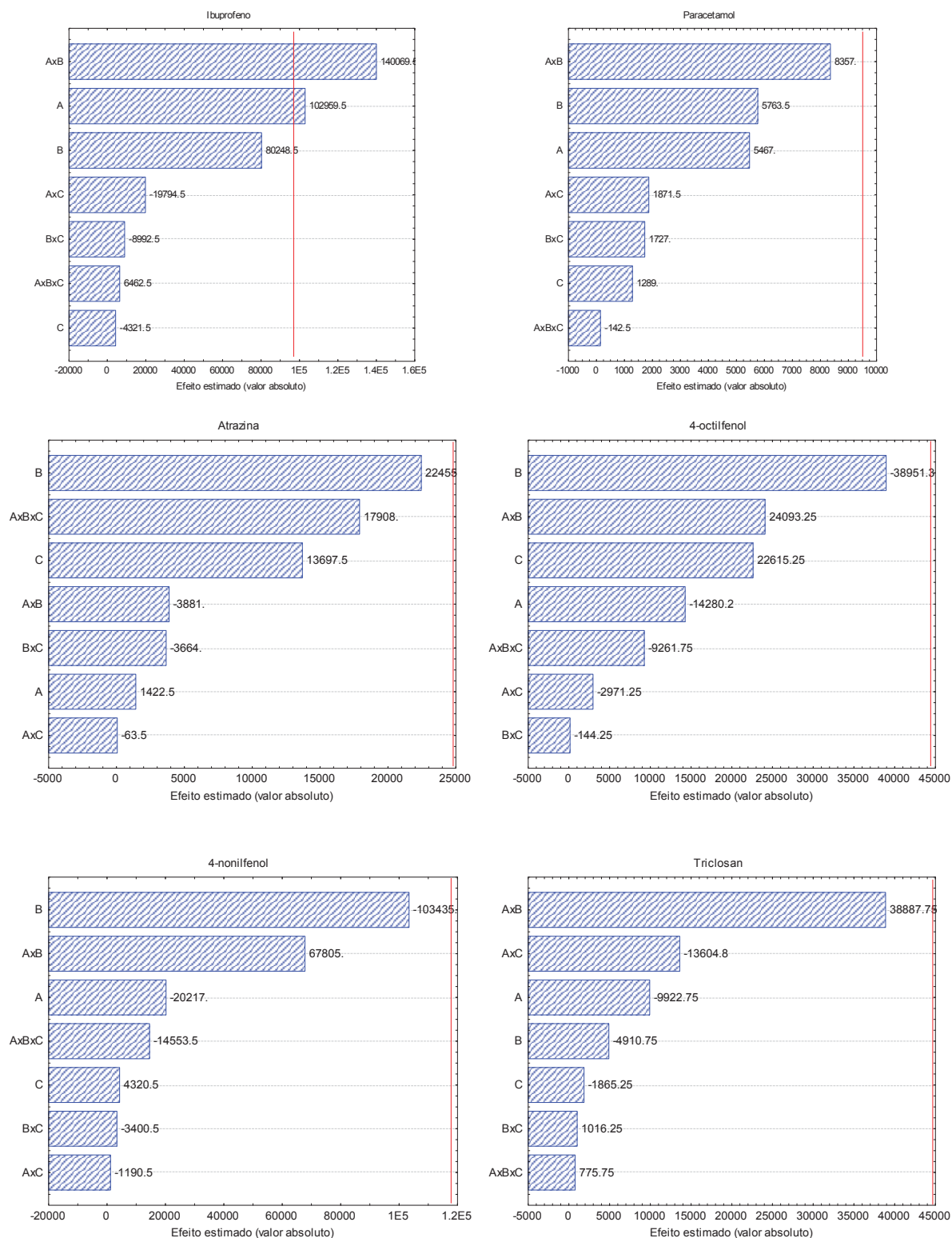
A Tabela a seguir apresenta o estudo dos efeitos das variáveis pH de extração (X1), força iônica (X2), tempo de extração (X3), temperatura de extração (X4) e tempo de dessorção (X5) utilizando o delineamento Plackett-Burman. Efeitos em negrito são significantes para o analito.

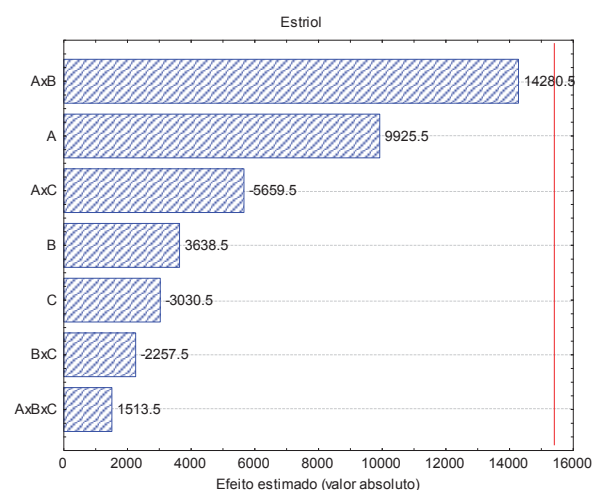
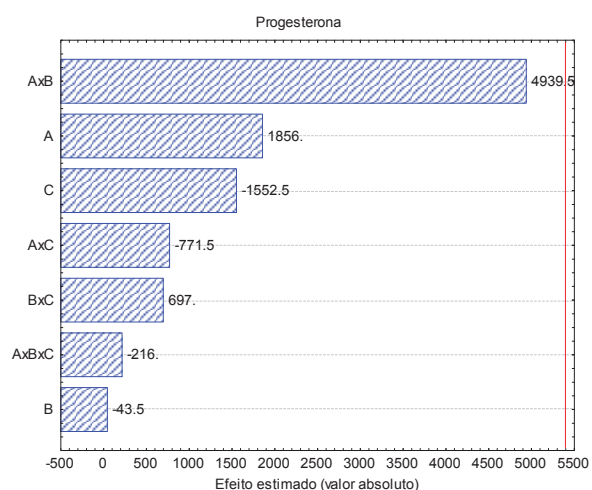
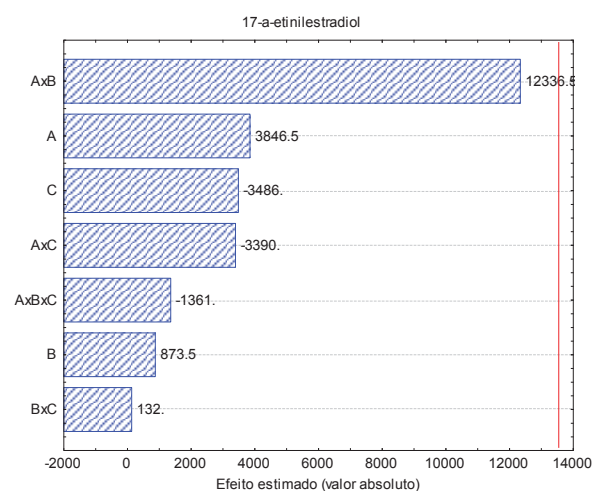
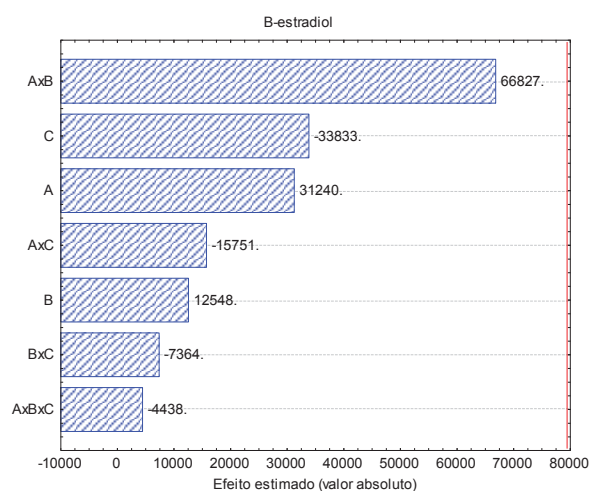
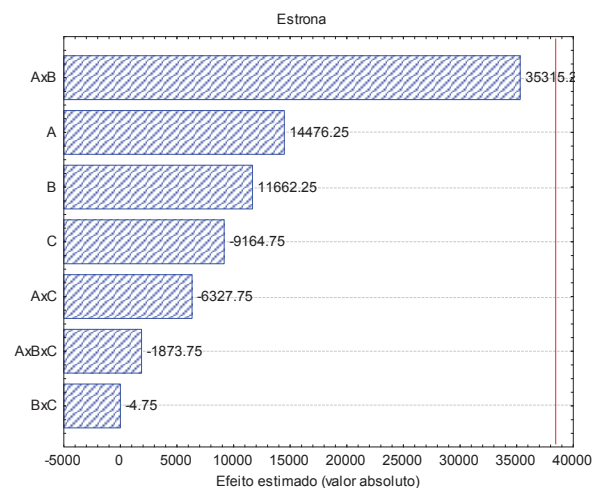
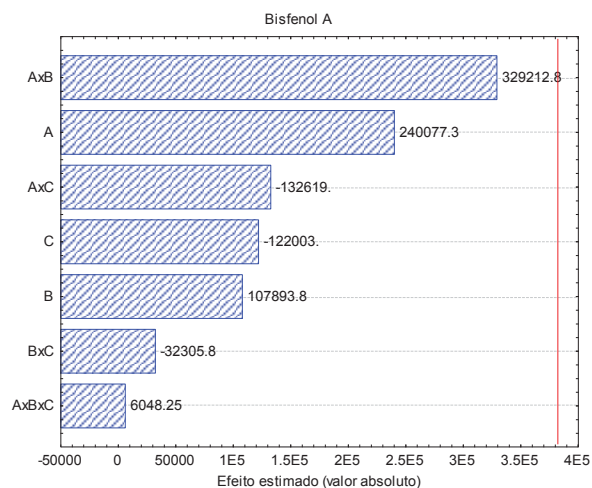
Ibuprofeno							
Média	94173,8	Desvio padrão	62782,5	Desvio padrão %	66,7	Resposta	133727
	+	X1	X2	X3	X4	X5	
Soma +	125565	30213	79918	36284	8424	18458	
Soma -	0	86707	37002	80636	108496	98462	
Total Soma	125565	116920	116920	116920	116920	116920	
Diferença	125565	-5494	42916	-44352	-100072	-80004	
Efeito	10463	-9415	7152,7	-7392	-16678,7	-13334	
Paracetamol							
Média	289,5	Desvio padrão	123,7	Desvio padrão %	42,8	Resposta	263,6
	+	X1	X2	X3	X4	X5	
Soma +	12768	6602	8083	6415	1574	4365	
Soma -	0	3828	2347	4015	8856	6065	
Total Soma	12768	10430	10430	10430	10430	10430	
Diferença	12768	2774	5736	2400	-7282	-1700	
Efeito	1064	462,3	956	400	-1213,7	-283,3	
Atrazina							
Média	987	Desvio padrão	116,7	Desvio padrão %	11,8	Resposta	248,6
	+	X1	X2	X3	X4	X5	
Soma +	38956	10122	25818	13546	19535	12301	
Soma -	0	24743	9047	21319	15330	22564	
Total Soma	38956	34865	34865	34865	34865	34865	
Diferença	38956	-14621	16771	-7773	4205	-10263	
Efeito	3246	-2436	2795	-1295	700	-1710	
4-octilfenol							
Média	41125,4	Desvio padrão	31360,3	Desvio padrão %	76,2	Resposta	66797
	+	X1	X2	X3	X4	X5	
Soma +	1577348	728271	333335	586936	715755	423998	
Soma -	0	643450	1038386	784785	655966	947723	
Total Soma	1577348	1371721	1371721	1371721	1371721	1371721	
Diferença	1577348	84821	-705051	-197849	59789	-523725	
Efeito	131445,7	14136,8	117508,5	-32974,8	9964,8	-87287,5	
4-nonilfenol							
Média	32026,6	Desvio padrão	31079,3	Desvio padrão %	97,0	Resposta	66198,8
	+	X1	X2	X3	X4	X5	
Soma +	108778	643264	366363	451137	506346	350363	
Soma -	0	284385	561286	476512	421303	577286	
Total Soma	1087782	927649	927649	927649	927649	927649	
Diferença	1087782	358879	-194923	-25375	85043	-226923	
Efeito	90648,5	59813,2	-32487,2	-4229,2	14173,8	-37820,5	

Triclosan							
Média	10326,2	Desvio padrão Triclosan			61,9	Resposta	13613,4
	+	X1	X2	X3	X4	X5	
Soma +	646432	325352	161183	323283	300115	151385	
Soma -	0	269449	433618	271518	294686	443416	
Total Soma	646432	594801	594801	594801	594801	594801	
Diferença	646432	55903	-272435	51765	5429	-292031	
Efeito	53869,3	9317,2	-45405,8	8627,5	904,8	-48671,8	
Bisfenol A							
Média	3266,8	Desvio padrão	1611,4	Desvio padrão %	49,3	Resposta	3432,3
	+	X1	X2	X3	X4	X5	
Soma +	164064	72407	107150	70760	48597	57391	
Soma -	0	75323	40580	76970	99133	90339	
Total Soma	164064	147730	147730	147730	147730	147730	
Diferença	164064	-2916	66570	-6210	-50536	-32948	
Efeito	13672	-486	11095	-1035	-8422,7	-5491,3	
Estrona							
Média	1143,5	Desvio padrão	0,7	Desvio padrão %	0,06	Resposta	1,5
	+	X1	X2	X3	X4	X5	
Soma +	34562	12072	21632	14941	15679	12315	
Soma -	0	20203	10643	17334	16596	19960	
Total Soma	34562	32275	32275	32275	32275	32275	
Diferença	34562	-8131	10989	-2393	-917	-7645	
Efeito	2880,2	-1355,2	1831,5	-398,8	-152,8	-1274,2	
β-estradiol							
Média	1099,6	Desvio padrão	993,0	Desvio padrão %	90,3	Resposta	2115,2
	+	X1	X2	X3	X4	X5	
Soma +	74600	33778	50517	39147	29992	30896	
Soma -	0	35324	18585	29955	39110	38206	
Total Soma	74600	69102	69102	69102	69102	69102	
Diferença	74600	-1546	31932	9192	-9118	-7310	
Efeito	6216,7	-257,7	5322	1532	-1519,7	-1218,3	
17-α-etinilestradiol							
Média	228,4	Desvio padrão	168,9	Desvio padrão %	73,9	Resposta	359,9
	+	X1	X2	X3	X4	X5	
Soma +	10743	4862	6379	4911	2731	3910	
Soma -	0	4739	3222	4690	6870	5691	
Total Soma	10743	9601	9601	9601	9601	9601	
Diferença	10743	123	3157	221	-4139	-1781	
Efeito	895,3	20,5	526,2	36,8	-689,8	-296,8	
Progesterona							
Média	172	Desvio padrão	38,2	Desvio padrão %	22,2	Resposta	81,3
	+	X1	X2	X3	X4	X5	
Soma +	6266	2053	4315	1575	1136	1117	
Soma -	0	3869	1607	4347	4786	4805	
Total soma	6266	5922	5922	5922	5922	5922	
Diferença	6266	-1816	2708	-2772	-3650	-3688	
Efeito	522,2	-302,7	451	-462	-608,3	-614,7	

APÊNDICE B

Gráficos de Pareto para os efeitos obtidos no delineamento fatorial 2^3 com configuração em estrela. Sendo A a variável - força iônica, B – temperatura de extração e C – tempo de dessorção.





GLOSSÁRIO

<i>Capillary electrophoresis</i>	Eletroforese capilar
<i>Carryover</i>	Efeito de memória
<i>Central composite design</i>	Planejamento composto central
<i>Collision-induced dissociation</i>	Colisão induzida por dissociação
<i>Electron capture detector</i>	Detector por captura de elétrons
<i>et al</i>	e outros
<i>Flame ionization detector</i>	Detector por ionização em chama
<i>Full scan</i>	Varredura total de íons
<i>Gas chromatography</i>	Cromatografia gasosa
<i>Google maps</i>	Mapas do Google
<i>Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis</i>	Diretrizes harmonizadas para validação de laboratório único de métodos de análise
<i>High performance liquid chromatography</i>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>Headspace</i>	Fase gasosa
<i>Infrared spectroscopy - attenuated total reflectance</i>	Espectroscopia na região do infravermelho – reflectância total atenuada
<i>Insert</i>	Inserto (vidraria)
<i>In-tube</i>	Em tubo
<i>Ion trap</i>	Aprisionamento de íons
<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<i>Labmade</i>	Feito em laboratório
<i>Liquid chromatography</i>	Cromatografia líquida
<i>Liquid-liquid extraction</i>	Extração líquido-líquido
<i>Mass spectrometry</i>	Espectrometria de massas
<i>Multiple reaction monitoring</i>	Monitoramento de reações múltiplas

<i>Nitrogen phosphorus detector</i>	Detector de nitrogênio e fósforo
<i>Relative standart deviation</i>	Desvio padrão relativo
<i>Restrite acess material</i>	Material de acesso restrito
<i>Scanning electron microscope</i>	Microscopia eletrônica de varredura
<i>Single ion monitoring</i>	Monitoramento seletivo de íons
<i>Solid-phase extraction</i>	Extração em fase sólida
<i>Solid-phase microextraction</i>	Microextração em fase sólida
<i>South</i>	Sul
<i>Swelling index</i>	Grau de intumescimento
<i>Thermal conductivity detector</i>	Detector por condutividade térmica
<i>Time of flight</i>	Tempo de voo
<i>West</i>	Oeste